

L-グルコース代謝の遺伝・生化学的研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 清水 哲 |
| 内容記述 | この博士論文は一部（第六章）が非公開になっています |
| 発行年 | 2013 |
| 学位授与大学 | 筑波大学 (University of Tsukuba) |
| 学位授与年度 | 2013 |
| 報告番号 | 12102甲第6683号 |
| URL | http://hdl.handle.net/2241/00121716 |

L-グルコース代謝の遺伝・生化学的研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生命共存科学専攻

博士（農学）学位論文

清水 哲

| | |
|--|-----|
| 目次 | |
| 第一章 序論 | 3 |
| 第一節 解糖系 | 3 |
| 第二節 糖の化学的性質と自然界での存在比 | 4 |
| 第三節 生物史以前の糖の起源 | 5 |
| 第四節 グルコース代謝のホモキラリティー | 6 |
| 第五節 本研究の目的と本論文の構成 | 7 |
| 第二章 L-グルコース資化菌の単離と同定 | 8 |
| 第一節 緒言 | 8 |
| 第二節 材料及び方法 | 8 |
| 第三節 集積培養による L-グルコース資化細菌の単離 | 14 |
| 第四節 L-グルコース資化菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析 | 16 |
| 第五節 まとめと考察 | 19 |
| 第三章 L-グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の同定と酵素学的解析 | 21 |
| 第一節 緒言 | 21 |
| 第二節 材料及び方法 | 21 |
| 第三節 L-グルコース代謝初段階反応の同定と L-グルコースデヒドロゲナーゼの精製 | 34 |
| 第四節 <i>lgdA</i> のクローニング | 39 |
| 第五節 LgdA の酵素学的諸性質の解析 | 44 |
| 第六節 <i>lgdA</i> を含む遺伝子クラスターの機能解析 | 54 |
| 第七節 LgdA の L-glucose を基質とした反応産物の同定 | 58 |
| 第八節 まとめと考察 | 61 |
| 第四章 <i>lgn</i> 遺伝子群のクローニングと機能解析 | 64 |
| 第一節 緒言 | 64 |
| 第二節 材料及び方法 | 64 |
| 第三節 L-グルコン酸デヒドロゲナーゼの精製 | 74 |
| 第四節 <i>lgn</i> 遺伝子群のクローニング | 78 |
| 第五節 Lgn タンパク質の機能解析 | 81 |
| 第六節 まとめと考察 | 95 |
| 第五章 L-グルコース代謝関連遺伝子の破壊とそれらの分子系統解析 | 99 |
| 第一節 緒言 | 99 |
| 第二節 材料及び方法 | 99 |
| 第三節 <i>Paracoccus</i> sp. 43P 株の遺伝子破壊方法の確立 | 105 |
| 第四節 L-グルコース代謝関連遺伝子の破壊が及ぼす影響 | 106 |
| 第五節 L-グルコース代謝関連遺伝子の分子系統解析 | 107 |
| 第六節 まとめと考察 | 116 |

第六章 LgnR による *lgn* 遺伝子群の転写制御機構エラー! ブックマークが定義されていません。

第一節 緒言 エラー! ブックマークが定義されていません。

第二節 材料及び方法 エラー! ブックマークが定義されていません。

第三節 *lgn* 遺伝子群の転写マッピング エラー! ブックマークが定義されていません。

第四節 *lgnR* の破壊が及ぼす影響 エラー! ブックマークが定義されていません。

第五節 His₆-LgnR のプロモーター領域への結合エラー! ブックマークが定義されていません。

第六節 LgnR の分子系統解析 エラー! ブックマークが定義されていません。

第七節 まとめと考察 エラー! ブックマークが定義されていません。

第七章 総括

121

第一章 序論

第一節 解糖系

D-glucose はセルロースに代表される植物性多糖の主要な構成要素であり、自然界で最も多く存在する単糖である。多くの生物にとって D-glucose は重要な炭素源、エネルギー源でもあり、D-glucose の分解経路である解糖系の存在は真核生物、真正細菌、古細菌からなる 3 つの生物ドメインすべてで確認されている。解糖系には細かな違いを含めればいくつかの種類が存在するが、代表的なものとしては Embden-Meyerhoff-Parnas (EMP) 経路、Entner-Doudoroff(ED)経路(Entner *et al.* 1952)の二つが挙げられる。実際には EMP 経路と ED 経路の 2 つの経路を両方有している生物、どちらかの経路のみを有している生物があり、両経路のうちどちらがより古い経路なのかという比較がなされてきた。最も進化的に古い生物であるとされる好熱性古細菌の多くが非リン酸化型の ED 経路 (Lamble *et al.* 2003)を有していることから、ED 経路のほうが EMP 経路よりも原始的な代謝経路であるとする説もある(Conway 1992)。その一方で ED 経路を有していない生物も多く存在するため、はっきりとした結論は出ていないのが現状である。

二つの経路の大きな違いとして、EMP 経路が 1 分子の D-glucose から 2 分子の ATP を產生するのに対し、ED 経路においては 1 分子の ATP しか產生しない点が挙げられる。しかしながら以下の化学式に示すように両経路の全体の反応は非常に良く似ている：

EMP 経路: $\text{D-glucose} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \Rightarrow 2\text{pyruvate} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$

ED 経路: $\text{D-glucose} + 2\text{NAD}^+ + \text{ADP} + \text{P}_i \Rightarrow 2\text{pyruvate} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + \text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$

両経路とも中間代謝物としてトリオースリン酸エステルを生じ、それ以降の反応は D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GapDH), triose phosphate isomerase (TPI), phosphoglycerate kinase (PGK)、phosphoglycerate mutase (PGM)、enolase、pyruvate kinase (PK) という 5 つの共通した酵素群が担っている。

EMP 経路、ED 経路のいずれにおいても、酸素が存在すれば生成した NADH を電子伝達系を介して再酸化するのに対して、嫌気的な条件においては生じた NADH を pyruvate などの有機物を電子受容体として NAD^+ に再酸化することで発酵を行う。解糖系の重要な点として、電子伝達系を介さず基質レベルで ATP を產生出来ることが挙げられる。そのため好気的な条件でのみ働く TCA サイクルに対して、解糖系は電子伝達系が停止する嫌気的な条件においても稼働し、ATP を產生することが出来る。

前述のように解糖系は古細菌を含めたすべての生物ドメインで見られることから、解糖系に関わる酵素遺伝子群は生物ドメインをまたいで保存性が見られる。なかでも ED 経路、EMP 経路に共通した下流部分、すなわちトリオースリン酸エステル代謝に関わる酵素遺伝

子群の保存性が極めて高いことが分かっており、分子系統解析からも古細菌、真正細菌、真核生物それぞれに見られる各酵素遺伝子が、ドメインをまたいで単一の祖先から分岐してきたものであることが示唆されている (Rominus *et al.* 2003)。

以上に述べたように、より原始的な環境であると考えられる嫌気条件でもエネルギー生産の基質として利用できる点、3つの生物ドメイン全てにその代謝経路が存在する点、それに関わる遺伝子の高い保存性から、D-glucose は生物史においてかなり早い段階からエネルギー源、炭素源として利用されてきたと考えられている。

第二節 糖の化学的性質と自然界での存在比

化学式としては $C_6H_{12}O_6$ であらわされる D-glucose には4つの不斉炭素が存在し、それぞれの立体配置によって他に15種の光学異性体（アルドヘキソース）が存在するうえ、アルデヒドがケトンに置き換わったケトヘキソース8種を含めると、全部で23種の異性体が存在する。しかしながら、自然界で実際に多く見られるヘキソースは D-glucose のほかに D-fructose、D-galactose、D-mannose のみであり、それ以外のヘキソースは自然界での存在量が著しく少ない、または存在自体が確認されていない。自然界に豊富なヘキソースの構造に目を向けると、D-fructose は D-glucose のアルデヒドがケトンに置き換わったものであり、D-galactose、D-mannose はそれぞれ D-glucose の C4、C2 の水酸基の立体配置が置き換わったエピマーである。すなわち、現在自然界に豊富に見られるヘキソースは例外なく D-glucose に近い構造を有している。これらの異性体は生体内において糖新生により生成した D-glucose を出発材料として作られており、それゆえ自然界に存在するヘキソースは D-glucose に近い構造を有していることが推察される。

理論的には数多くの異性体が存在する中で、生物はなぜ D-glucose に特化した代謝経路を發展させてきたのであろうか。その理由としては、他の単糖に比べ D-glucose が相対的に高い安定性を有している点が挙げられる (Bunn *et al.* 1981)。実際のところ、反応性の高いアルデヒド基またはケトン基を有する単糖は総じて安定な化合物ではなく、常温、常圧下においてもアミノ基と反応してしまう（糖化反応）。そのため生体内においても単糖の一部はタンパク質と反応し、このような非酵素的な糖化をうけたタンパク質は場合によっては本来の活性を失ってしまう。このような糖化反応が生体におよぼす影響は小さいものであると長らく考えられてきたが、近年の研究からヒトの体内で起こる糖化反応が糖尿病 (Urich *et al.* 2001)、白内障 (Gul *et al.* 2009) といった様々な病気と関連していることが明らかとなりつつある。糖化反応は鎖状構造を取った単糖とアミノ基との間で生じるため、他の単糖に比べて水溶液中での六員環構造が安定で鎖状構造の存在比が少ない D-glucose は、D-galactose、D-fructose といった他の単糖よりも糖化反応の進行が遅いことが知られている (Foray *et al.* 1988, Chiou *et al.* 1980, Suarezs *et al.* 1989)。それゆえ生体内においても他の糖より安定であることが考えられ、結果として D-glucose は生物進化の過程で数ある糖異性体から主要な炭素

源、エネルギー源として選択されてきたのではないかと考えられている (Bunn *et al.* 1981)。

安定性という観点で D-glucose が他のヘキソースに比べ優れており、それゆえ生物進化の過程で選択されたという主張は論理的ではあるが、重大な欠陥として鏡像異性体の問題を考慮していない点が挙げられる。鏡像異性体とは、あるキラル化合物を鏡に写したときの鏡像に相当する異性体を指し、D-glucose の場合その鏡像異性体にあたるのが、L-glucose である。D-glucose と L-glucose は鏡写しの関係にあり、両者は決して重なりあわない異なる化合物である。しかしながら、鏡像異性体同士は化学的、物理学的にまったく同じ性質を示し、旋光性によってのみ区別されうる。したがって L-glucose は D-glucose と同様の安定性を有しているはずであるが、自然界において L-glucose の存在はいまだに確認されておらず、また前述の解糖系は D-glucose の分解に特化した経路であるため、同経路に関わる酵素群は L-glucose を分解することはできない。それでは、なぜ生物は D-glucose に特異的な代謝経路を発展させてきたのだろうか？一つの可能性としては、生物が誕生する以前の原始の地球において、D 体の glucose のみが生成、蓄積しており、必然的に生物は環境中に存在していた D-glucose を利用する代謝経路を獲得し、存在していなかった L-glucose に対する代謝経路はそもそも発展させる必要がなかったと考えられる。この可能性を論じるには、原始地球で存在していた糖について考慮する必要があるが、この点については次節以降で考察する。

第三節 生物史以前の糖の起源

地球上で生物が誕生する以前の糖の起源としては、低分子が重合することで生成したとする化学進化説と、宇宙から隕石によって飛来したという説がある。前者の化学進化説による単糖の生成の根拠として示されているのが、1861 年に Boutlerow により発見された formaldehyde から糖を合成するホルモース反応である (Boutlerow 1861)。1959 年に Breslow が提案したホルモース反応過程 (Breslow 1959) は、formaldehyde の自己重合により glycolaldehyde や glyceraldehyde、dihydroxyacetone が生成し、これらがアルドール縮合を起こすことで tagatose や fructose といったケトヘキソース、ついでケトースからアルドースへの異性化反応が進むことによってアルドヘキソースが生成するというものである。これらの反応は塩基と 2 価金属により触媒され、初期の地球を模した実験では formaldehyde と glyceraldehyde からペントースが生成したとされる。ホルモース反応による単糖の生成は全て化学的な反応であるため、生成物はメソ体、すなわち等量の鏡像異性体を生じることとなる。後者の宇宙から隕石によって飛来したという説に関しては、実際に隕石からの抽出物を解析するという研究が行われているが、アミノ酸、低分子カルボン酸が隕石抽出物から検出された例がある (Cronin 1997, Engel *et al.* 1997, Cooper *et al.* 2011) 一方で、糖が検出された例はこれまでない。唯一 2001 年に Cooper らがマーチソン隕石、マレー隕石からの抽出物中に炭素数 3 から 6 までの糖のアルデヒドが還元、または酸化されたポリオールである

糖アルコール、アルドン酸、アルダル酸の存在を報告している (Cooper *et al.* 2001) のみであり、また Cooper らは検出された各化合物の光学異性体ならびに鏡像異性体の問題に関しては言及していない。

以上述べたように、現在考えられている生物が誕生する以前の糖の生成、供給経路は総じて光学選択的なものとはいえない。従って、生物が誕生する以前の地球においては、L-glucose、D-glucose が同程度の量で存在していた可能性を否定できない。それでは、D-glucose と同様に、L-glucose を利用する生物は存在しないのであろうか？

第四節 グルコース代謝のホモキラリティー

多くの生物によって D-glucose が利用されているのに対して、その鏡像異性体である L-glucose を炭素源、エネルギー源として生物が利用できるのかという単純な疑問について検討した例は、過去にいくつか存在する。もっとも古い例では、D-glucose の構造を決定した E. Fischer がビール酵母によって L-glucose が醗酵されるか検討したが、L-glucose は醗酵されないと報告している (Fischer 1890)。また 1940 年には Rudney が真正細菌の *Enterobacter aerogenes*、*Escherichia coli*、さらにラットを用いて L-glucose が分解されるか検討したが、いずれの細菌、細胞によっても L-glucose は分解されなかったとしている (Rudney 1940)。また 1979 年に Sasajima らは L-glucose を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素を *Burkholderia caryophylli* から精製したが、基質特異性を解析した結果、同酵素は L-glucose 特異的な酵素ではなく、D-arabinose に対してより強いデヒドロゲナーゼ活性を有しており、L-glucose に対する活性は基質特異性が低いために"たまたま"反応したものと考えられている (Sasajima *et al.* 1979)。1995 年には Livesey らが再度ラットを用いた検討を行ったがやはり L-glucose は代謝されず (Livesey *et al.* 1995)、近年では 2009 年に Sun らがカビ、酵母、細菌、古細菌を用いて L-glucose を分解できるか検討したが、いずれの株も D-glucose を単一炭素源として生育するのに対して、L-glucose を単一炭素源としては生育できず、また分解することもできないと報告している (Sun *et al.* 2009)。こうした経緯から、生物は L-glucose を利用することはできないとするのが一般的な認識である。

解糖系がそうであるように、生物は化学的、物理学的に等価な 2 つの鏡像異性体のうち片方のみを利用する傾向がある。例えば DNA、RNA に含まれる ribose、2-deoxyribose は例外なく D 体である。またタンパク質の生合成に見られるアミノ酸は不斉炭素を持たない glycine を除いてすべて L 体であることが知られている。総じて生物は、自然界での存在比と同様に D 体の糖、L 体のアミノ酸を利用する傾向があることから、これらをまとめて生命のホモキラリティー(biological homochirality)と総称する(Blackmond 2010)。しかしながら、D 体、L 体という表記は科学者が便宜的につけたもので、表記法自体も糖とアミノ酸で類似性はあるものの厳密には異なる。糖の場合はカルボニル基を上にして Fischer 投影式を書いたときに、カルボニル基から最も遠い不斉炭素における水酸基が右にくるのが D 体、左

にくるものが L 体である。一方アミノ酸の場合は主鎖カルボキシル基を上にして Fischer 投影式を書いた場合に、主鎖アミノ基が左にくるものが L 体、右にくるものが D 体である。従ってホモキラリティーの問題において、アミノ酸と糖を同列に扱うことは適切ではないといえる。また同じ糖であっても、D-ribose は D-glucose のように生物の炭素源、エネルギー源として分解されるのではなく、あくまで RNA の骨格を担う部品として生物によって合成されるものである。よって解糖系が D 体の glucose に特異的であることと、RNA、DNA の骨格が D 体の ribose、deoxyribose であることもまた、別個の問題として取り扱うことが必要だろう。

以上述べたように D-glucose の鏡像異性体である L-glucose を分解し、炭素源、エネルギー源として利用する生物は現在までのところ見つかっていない。このように生物が D 体の glucose のみを利用する現象は生命のホモキラリティーと総称されるものの一つではあるが、本研究では glucose 異化代謝に見られるホモキラリティーを独立した問題として論じる。

第五節 本研究の目的と本論文の構成

最も原始的な異化代謝経路のひとつであると推定される解糖系とは、D-glucose を 2 分子の pyruvate に分解し、その過程でエネルギーを得る経路である。一方で生物が誕生する以前の地球において、D 体の glucose のみが生成、蓄積したことを示す実証的な知見は今日においてもなお見受けられず、化学的に等価な DL-glucose のうちなぜ D-glucose のみが生物により選択されたのかという問いに対して、明確な答えは得られていない。

そこで本研究の目的として、これまで生物には分解できないといわれてきた L-glucose を分解、資化する生物を探索し、その L-glucose 代謝機構を明らかにすることを設定した。この研究により新たに得られる知見は、glucose 異化代謝のホモキラリティー形成の起源を考えるうえで重要な手がかりとなるだろう。

本研究の構成は以下のとおりである。まず第二章では L-glucose 資化菌の単離とそれらの 16S rRNA 遺伝子配列に基づく分子系統解析について述べる。第三章では L-glucose 資化菌として単離された *Paracoccus* sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路の初発酵素、L-glucose dehydrogenase の精製、遺伝子の同定、ならびに酵素学的諸性質について述べる。第四章では L-gluconate dehydrogenase の精製、遺伝子の同定、ならびに同酵素遺伝子を含む遺伝子クラスター *lgn* 遺伝子群のクローニング、ならびに各酵素の機能について述べる。第五章では同定した L-glucose 代謝関連遺伝子群の破壊が L-glucose、ならびに各中間代謝物の資化に及ぼす影響について述べる。第六章では IclR ファミリー転写調節因子、LgnR による *lgn* 遺伝子群の転写制御機構について述べる。最後に第七章で、本研究全体の総括と、今後の展望について述べる。

第二章 L-グルコース資化菌の単離と同定

第一節 緒言

前章で述べたように、L-glucose を分解できる生物がいないとする認識は研究室で使用されている限られた菌株、組織を用いた研究の結果に基づくものであり、自然界の生物が L-glucose を分解できないことを示したものではない。L-glucose 資化細菌がいたとして、それが未知の代謝系によるものか、既知の酵素の隠された基質特異性によるものであるかはわからないが、本研究ではまず L-glucose を資化することが出来る微生物を環境中から探し出し、分離株について 16S rRNA 遺伝子の解析を行い、配列に基づく分類学的解析を行った。

第二節 材料及び方法

2-2-1 実験材料

使用培地

集積培養には L-glucose 最少培地 (Table 2-2-1)を用いた。L-glucose 資化菌の分離については L-glucose 最少寒天培地のほかに LB 寒天培地、YPD 寒天培地 (Table 2-2-2)を用いた。固体培地における agar の量は 1.5 % (w/v)とした。

2-2-2 L-glucose 資化菌の集積培養

Table 2-2-1 に示した L-glucose 最少培地 10 ml を大試験管にとり、筑波大学周辺の土壌や底泥サンプル 0.5 g を加え、30℃、120 rpm、好気条件で培養した。1 日ごとに培養液中の還元糖量を DNS 法 (Miller 1959) により測定し、培養液中の還元糖量が 10%以下となったところで新たな L-glucose 最少培地に 1%接種することで継代し、同条件で培養した。2 回継代を繰り返した後は、還元糖量に加えて O.D. 600 nm の吸光度を測定し、各培養液の菌体濃度を測定した。

2-2-3 DNS 法による還元糖量の測定

1) DNS 試薬の調製

0.5 g 3,5-dinitrosalicylic acid、1.6 g NaOH、30 g potassium sodium tartarate に 100 ml の蒸留水を加えて 30 分間攪拌することで溶解させ、DNS 試薬とした。

2) 検量線の作成

D-glucose 及び L-glucose についてそれぞれ 0、0.5、1、2、3、4、5 $\mu\text{mol}/0.5\text{ ml}$ の濃度の溶液 0.5 ml を調製し、それに対して DNS 試薬 1 ml を加え、よく攪拌した後に沸騰浴中で 5 分間加熱し、反応させた。流水で冷却後、蒸留水 4.5 ml で希釈し 535 nm の吸光度を測定し検量線を作成した。

3) 培養液中の還元糖量の測定

各サンプルより培養液 0.5 ml をエッペンチューブにとり、4℃、15000 rpm で 10 分間遠心した。上清 100 μl を蒸留水 400 μl で希釈し 0.5 ml とした後、DNS 試薬 1 ml を加え、よく攪拌した後に沸騰浴中で 5 分間加熱し、反応させた。流水で冷却後、蒸留水 4.5 ml で希釈し 535 nm の吸光度を測定して、検量線より還元糖量を定量した。

2-2-4. L-glucose 資化菌の純粋分離

各集積培養サンプルを滅菌生理食塩水で 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} に希釈して、100 μl を L-glucose 最少寒天培地、YPD 寒天培地にそれぞれ 3 枚ずつプレーティングを行い、30℃で培養した。生育してきたコロニーを L-グルコース最少寒天培地につまようじで植菌して 30℃で培養し、生育の見られたものに関しては L-glucose 最少液体培地に 1 白菌耳接種した。生育してきた培養液を滅菌生理食塩水で 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} に希釈してそれぞれ YPD 寒天培地にプレーティングし、生育してきたコロニーをそれぞれ分離した。

2-2-5. L-glucose 資化細菌の生育に伴う培養液中の還元糖量の測定

1) 前培養

分離株のプレートより各菌株をそれぞれ 1 白金耳とり、大試験管にとった 5 ml の YPD 液体培地、または LB 培地にそれぞれ植菌して 30℃、120 rpm、好気条件で 12 時間から 24 時間培養した。

2) 本培養

各前培養液 1 ml をとり 15,000 rpm、4℃で 5 分間遠心して菌体を回収した。1 ml の滅菌生理食塩水を加え、ボルテクスミキサーで攪拌して再度 15,000 rpm、4℃で 5 分間遠心する操作を 2 回繰り返して菌体を洗浄後、1 ml の滅菌生理食塩水に懸濁して大試験管にとった 10 ml の L-glucose 最少培地に O.D. = 0.1 となるように植菌して 30℃、120 rpm で培養し、経時的に O.D. 600 nm を測定することで菌体濃度を測定し、1-2-2 に従って培養液中の還元糖量を測定した。

2-2-6. ゲノム DNA の調製

中試験管にとった 5 ml の YPD 液体培地、または LB 培地に L-glucose 資化菌をそれぞれ 1

白金耳植菌し、12時間から24時間培養した。培養液1.5 mlをエッペンチューブにとり、15,000 rpm、4℃で5分間遠心することで菌体を回収した。菌体を360 µlのT.E.バッファーに懸濁し、40 µlの10 mg/ml リゾチーム・1 µg/mlのRNase溶液を加えて37℃で15分間静置した。50 µlの10% SDSを加えて37℃で10分間静置後、100 µlのNaClO₄を加えた後、600 µlのフェノールクロロホルムを加えて激しく攪拌した。15,000 rpm、24℃で15分間遠心し、上清約400 µlをエッペンチューブにとり、1 mlの氷冷エタノールを静かに加え、水層との界面に析出したゲノムDNAをつまようじで巻き取り、5分間風乾後に100 µlのT.E.バッファーに溶解させた。

2-2-7. 16S rRNA 遺伝子の解析

PCR およびシーケンス PCR に用いたプライマーは Table 2-2-3 に示した。

1) 16S rRNA 遺伝子の PCR 増幅

L-glucose 資化菌より抽出したゲノムDNAをテンプレートとして、16S rRNA 遺伝子のユニバーサルプライマーセットである27F、1492RプライマーおよびTakara Ex Taqを用いてPCRを行った。PCR反応液を1%アガロースゲルで電気泳動後、約1,500 bpの増幅断片をUltraClean 15 DNA Purification Kitを用いて抽出した。

2) シーケンス PCR

シーケンス PCR は BECKMAN COULTER GenomeLab DTCS Quick Start Kit を用いてプロトコルにしたがって行った。プライマーは16SrRNA 遺伝子配列に基づくユニバーサルプライマーである27Fを用いた。解析した塩基配列約500 bpをBLAST上で検索し、相同性の見られたデータベース上の配列からL-グルコース資化菌の簡易同定を行った。その後43A、43P、32K、1M2、32Sの5株については357F、926F、1094F、518R、805R、1111R、1492Rユニバーサルプライマーを用いて16S rRNA 遺伝子全長を解析した。解析した配列はGenetyxを用いて連結し、BLAST検索に供した。

2-2-8. 分子系統樹の作製

得られた43P株の16S rRNA 遺伝子配列と、*Paracoccus* 属細菌、アウトグループとして*Rhodobacter sphaeroides*の16S rRNA 遺伝子配列を用いて、CLUSTALX (Larkinn et al. 2007)によりアライメントを作製し、ついで得られたアライメントをもとにMEGA4 (Tamura et al. 2007)を用いてNeighbor-joining法に基づく分子系統樹の作製を行った。

Table 2-2-1. L-glucose minimal medium

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| NH ₄ Cl | 0.54 g |
| KCl | 0.52 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.52 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.53 g |
| K ₂ HPO ₄ | 1.06 g |
| L-glucose | 2.5 g |
| *Hutner's trace element solution | 2 ml |
| <hr/> | |
| | 1 L (pH 7.0) |

Hutner's trace element solution

| | |
|---|--------|
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 2.2 g |
| H ₃ BO ₃ | 1.1 g |
| MnCl ₂ ·4H ₂ O | 0.5 g |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.5 g |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | 0.16 g |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.16 g |
| (NH ₄)MoO ₄ ·4H ₂ O | 0.11 g |
| <hr/> | |
| | 1 L |

Table 2-2-2. YPD and LB medium

YPD medium

| | |
|---------------|------|
| Yeast extract | 10 g |
| Polypeptone | 10 g |
| D-glucose | 10 g |
| <hr/> | |
| 1 L (pH 7.0) | |

LB medium

| | |
|---------------|------|
| Tryptone | 10 g |
| Yeast extract | 5 g |
| NaCl | 10 g |
| <hr/> | |
| 1 L (pH 7.4) | |

Table 2-2-3. Primers used in 16S rRNA gene sequence analysis

| Primer | Sequence (5'-3') |
|--------|----------------------|
| 27F | AGAGTTTGATCMTGGCTCAG |
| 357F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG |
| 926F | AAACTCAAAGGAATTGACGG |
| 1094F | GTCCCGCAACGAGCGCAAC |
| 518R | GTATTACCGCGGCTGCTGG |
| 805R | GACTACCAGGGTATCTAATC |
| 1492R | GGYTACCTTGTTACGACTT |

第三節 集積培養による L-グルコース資化細菌の単離

2-3-1. L-glucose の定量法の確立

DNS 法により L-glucose の定量が可能かどうかを検討したところ、D-glucose と同様の検量線を得ることができた(Fig. 2-3-1)ので、集積培養過程の L-glucose の定量は得られた検量線を用いて行うこととした。

2-3-2. L-glucose 資化菌の取得

筑波大学周辺の土壌や底泥 50 サンプルを L-glucose 最少液体培地で培養し、集積培養を行ったところ、11 のサンプルで継続的な生育に伴う L-glucose の減少が確認された。これらのサンプルを新たな L-glucose 最少液体培地に 1%接種し、経代培養を行ったところ、全てのサンプルで L-glucose の減少に伴う生育が観察され、2 日から 3 日後には full growth にまで達した。このことから L-glucose 資化菌は自然環境中に予想外に多く存在していることが考えられた。

L-glucose 資化菌をこの培養液から分離するため、合計 5 回から 10 回の集積培養を行った培養液を適宜希釈し、L-glucose 最少寒天培地、YPD 寒天培地に塗布し、分離を行った。その結果、98 の L-glucose 資化菌候補株を得た。得られた候補株についてそれぞれ L-glucose 最少液体培地での生育と還元糖量の減少を確認したところ、21 株について生育に伴う培地中の還元糖量の減少が観察された。そこでこれらの分離株を用いて以降の解析を行った。

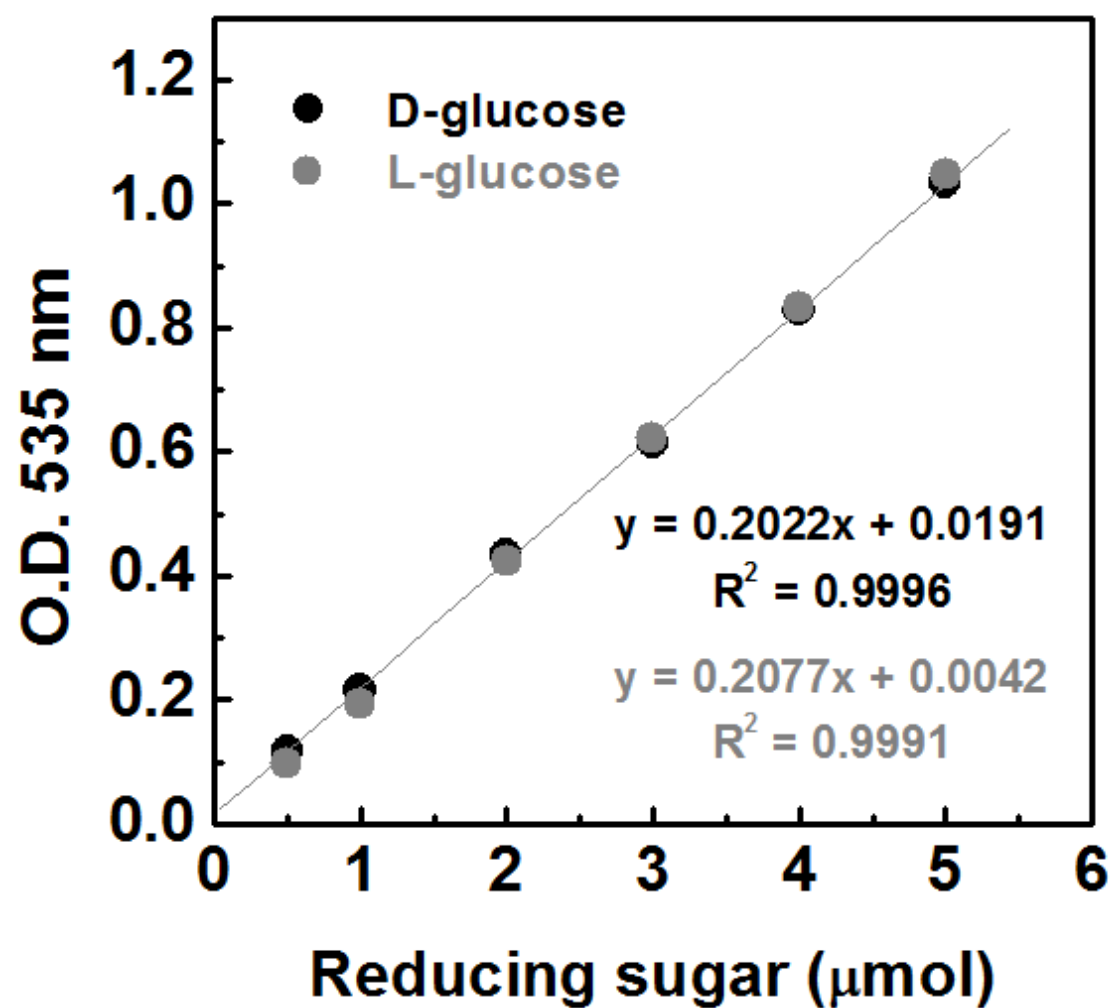


Figure 2-3-1. Standard curve for quantification of reducing sugars in culture medium by the DNS method.

Symbols: Black circles, D-glucose; gray circles, L-glucose

第四節 L-グルコース資化菌の 16S rRNA 遺伝子配列解析

2-4-1. L-glucose 資化菌の簡易同定および 16S rRNA 遺伝子の全長解析

得られた L-glucose 資化菌について 16S rRNA 遺伝子上流領域約 500 bp の塩基配列を決定し、既知菌株の配列と相同性検索を行ったところ、分離株はすべて *α-Proteobacteria* 綱に分類されることが推定された。さらに分離株において最も強い L-グルコース資化能を有する 43P 株について 16S rRNA 遺伝子の全長を解析したところ、*Paracoccus denitrificans* PD1222 株と 97% の塩基配列相同性を示した。さらに分子系統樹を作成したところ、43P 株は既知の *Paracoccus* 属細菌とクラスターを形成した(Fig. 2-4-2)ので、同株は *Paracoccus* 属に属することが明らかとなった。一方で 43P 株と系統的に近い *Paracoccus denitrificans* NBRC102528^T は L-glucose 最少培地で生育することが出来なかった(Fig. 2-4-3)。

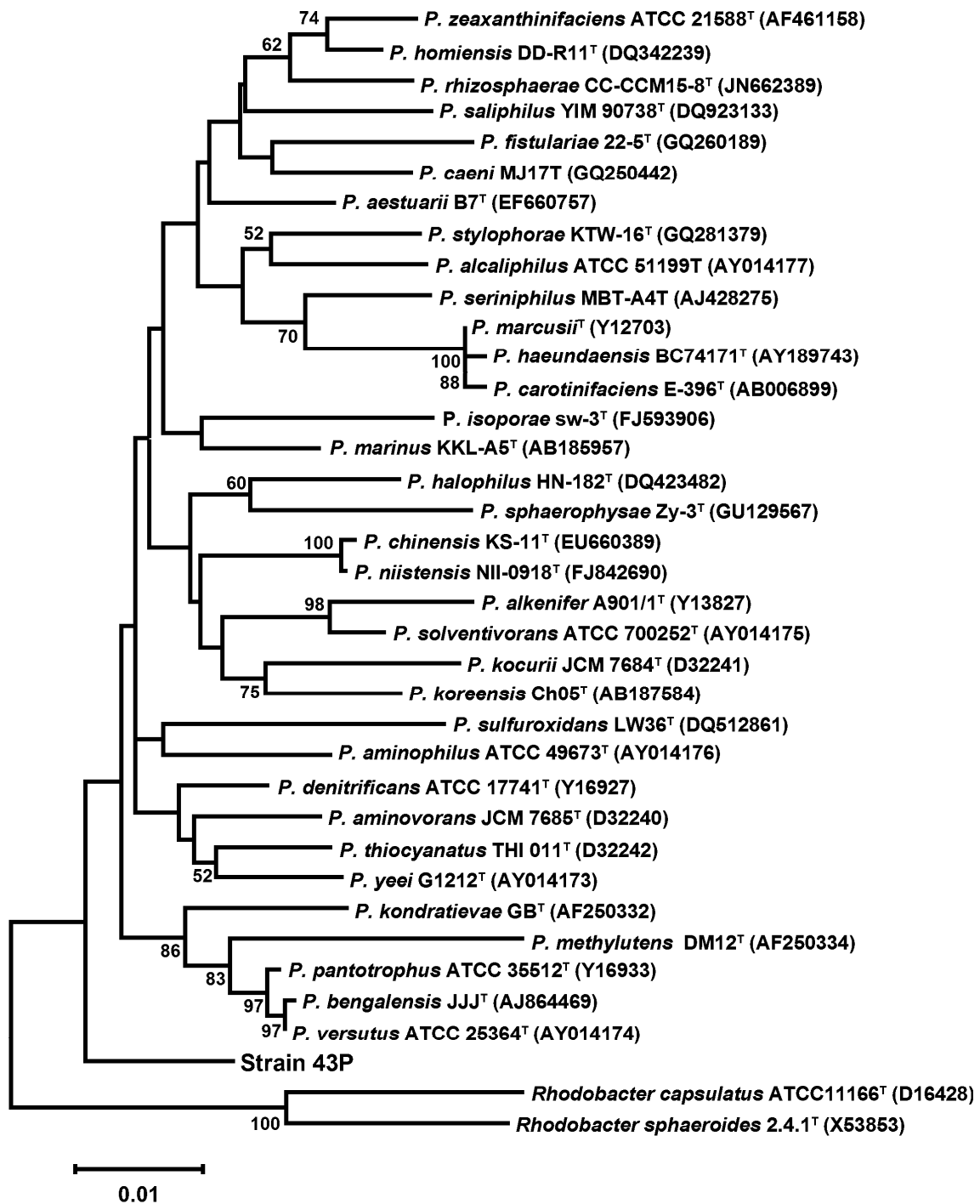


Figure 2-4-2. A phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence of strain 43P and those of type strains belonging to genus *Paracoccus* and *Rhodobacter*.

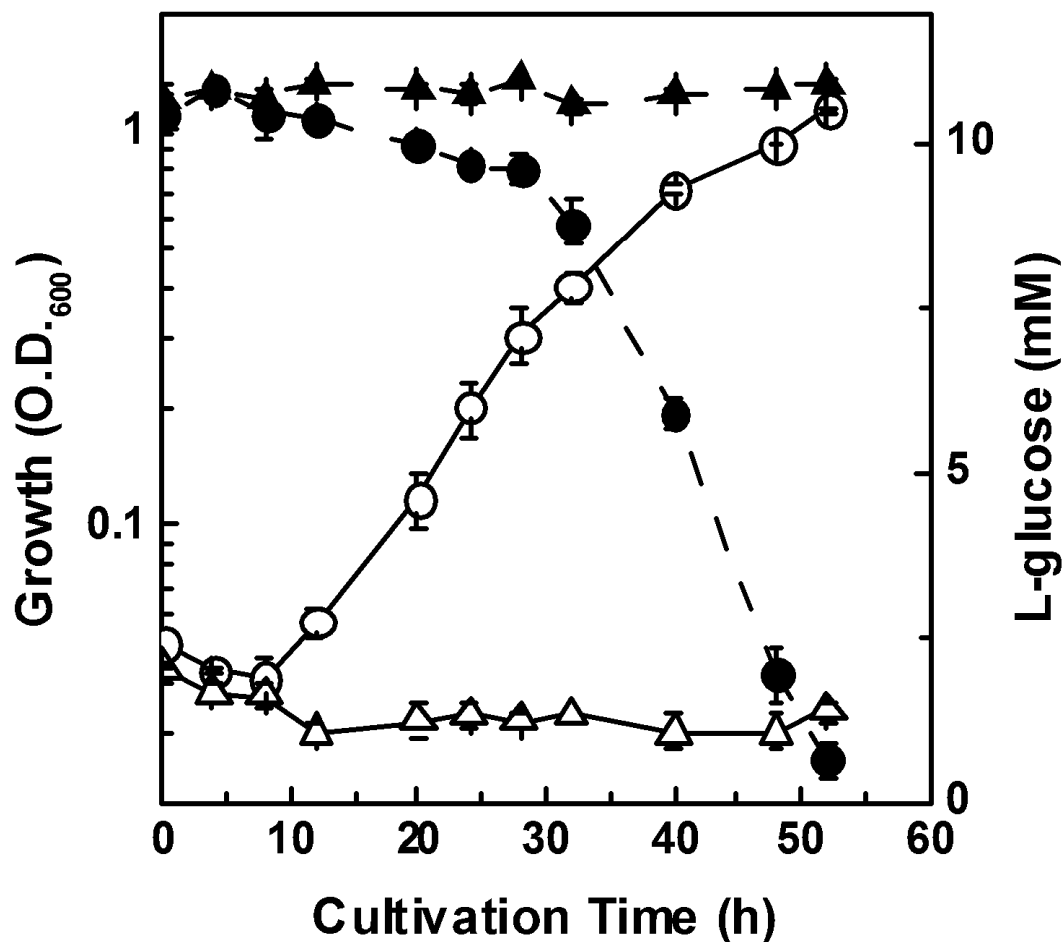


Figure 2-4-3. Growth (open symbols) and L-glucose consumption (closed symbols) of strains 43P (circles) and NBRC 102528^T (triangles) in L-glucose minimal medium. Growth was monitored by measuring the absorbance at 600 nm. The DNS method was used to determine the L-glucose concentration by measuring the reducing sugars in the culture medium of strains 43P and NBRC 102528^T. Cultivation was conducted in three independent cultures and average values \pm S. D. are shown.

第五節 まとめと考察

本章では、環境中から L-glucose を単一炭素源として生育可能な微生物を初めて単離することに成功した。この結果はこれまで生物により分解されないとされてきた L-glucose を分解し、さらに単一炭素源、エネルギー源として利用できる生物の存在を示したという点において重要である。単離された菌株において最も強い L-glucose 資化能を有していたのが *Paracoccus* 属の細菌と予想される 43P 株であった。*Rhodobacterales* 目の一員である同株は、他の L-glucose 資化細菌よりも L-glucose 最少培地中で非常に短い誘導期を経て増殖段階に移行することが可能であったことから、他の L-glucose 資化菌とは異なる代謝経路を有している可能性が考えられる。また、43P 株と系統的に近縁である *Paracoccus denitrificans* NBRC102528^T は L-glucose を単一炭素源として生育できなかったことから、同株の L-glucose 資化能は *Paracoccus* 属細菌に広く保存されているわけではないことが考えられる。

本研究のようにある化合物の資化性を選択圧として集積培養を行った場合、その化合物を代謝する生物が生産する分解産物をエネルギー源として生育している微生物も同様に集積されてしまう点が問題である。実際に今回のスクリーニングで 10 回以上の集積培養を繰り返しても、8 割以上の分離株は L-glucose を単一炭素源として生育することが出来なかった。理論的には L-glucose 最少寒天培地に塗布すれば L-glucose 資化細菌が分離できるはずだが、最少培地に生育してくるコロニーは非常に小さく、多くの場合は 2 種から 3 種の微生物が混在していることが多いため、そこからさらに分離を要する。そのために YPD 培地のような完全培地で分離し、その後改めて L-glucose 資化性を個別に確認することで L-glucose 資化菌を分離することが必要であった。本研究に用いられた手法は、特定の化合物の資化性を基準とした微生物のスクリーニングに対して有効な手段であろう。また、バクテリアの培養に広く用いられている LB 培地であるが、本研究の過程で得られた候補株の多くは LB 培地で生育することが出来なかったため、YPD 培地を使用することにした。環境サンプルからのスクリーニングによる未知の微生物の分離に際しては、完全培地の選択についても検討を行う必要があるだろう。

集積培養の過程で突然サンプルの菌体濃度が減少することがあったが、ひとつは培養に伴う有機酸生成に伴う pH の下降が原因であり、もうひとつは原生動物の増殖によるものであった。pH の下降に対する方策としては緩衝能を持つ化合物、たとえば potassium phosphate の濃度を上げることが必要であり、本研究でも potassium phosphate の濃度を 20 mM に上げることで培養過程での pH の低下に伴う菌体濃度の減少を抑制することに成功した。ある化合物の資化性を基準としたスクリーニングを行う場合、用いる化合物のモル濃度に対して十分な量の緩衝能をもつ塩類を添加することが望ましい。また、原生動物の増殖を抑えるためには、真核生物に特異的に作用する抗生物質であるシクロヘキシミドを添加することが有効であった。

本研究では培養液中の L-glucose の定量に DNS 法を用いたが、この方法は一般的な還元

糖量の定量法に用いられるソモギ法と比較して簡便であり、試薬の安定性も非常に高かった。特に集積培養のようなルーチンワークにおいては、実験操作の簡便さが重要であるので、DNS 法を用いた還元糖の定量はその点で優れており、感度も十分であった。

16S rRNA 遺伝子の解析に際して、本研究では PCR 産物を直接シーケンス解析する手法をとったが、ユニバーサルプライマーを用いたシーケンスではわずかなゲノムのコンタミネーションによるバックの影響が強く出るので、適当なベクター、たとえば pGEM Teasy クローニングベクターなどにサブクローニングした後にプラスミドをシーケンスしたほうがより確実なシーケンス解析が出来ると考えられる。

本研究におけるスクリーニングは一定の条件で集積培養を行ったため、今後は窒素源、培養温度、pH、通気、biotin や TPP といった補欠因子の添加の有無といった細かい条件を変化させることで、新規な L-glucose 資化菌を取得できる可能性も考えられる。また今回の集積培養ではシクロヘキシミドを添加し、原核生物に標的を絞ったスクリーニングを行った。従って酵母、カビといった真核生物は集積培養の過程で排除されているため、L-glucose 代謝の生物ドメインをまたいだ普遍性を考える意味で、真核生物を対象としたスクリーニングを行うことも今後必要であろう。

第三章 L-グルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子の同定と酵素学的解析

第一節 緒言

糖代謝の初段階反応としては、EMP 経路における D-glucose の ATP 依存的なリン酸化による D-glucose-6-phosphate への変換が最も有名であるが、他に ED 経路で見られる酸化反応や、還元、異性化など様々な反応が知られている。そのため分離した L-glucose 資化細菌の L-glucose 代謝の初段階反応が、D-glucose 代謝と同様にリン酸化反応であるとは限らない。本章では得られた L-glucose 資化菌の中で最も L-glucose を炭素源とした生育が良好であった *Paracoccus* sp. 43P 株の無細胞抽出液を用いて、L-glucose を基質とした活性を検出し、次いで同反応を触媒する酵素の精製、遺伝子クローニング、さらに酵素学的諸性質の解析を行った。

第二節 材料及び方法

3-2-1. 実験材料

使用培地

Paracoccus sp. 43P 株の前培養には LB 培地 (Table 2-2-2) を用いた。無細胞抽出液の調製に際しては前章より若干改変を加えた L-glucose 最少培地 (Table 3-2-1)に加え、同培地の炭素源を L-glucose から D-glucose、D-galactose にそれぞれ置き換えた培地も使用した。L-glucose dehydrogenase の精製に際しては、D-galactose 培地 (Table 3-2-2) を用いた。

使用プライマー

L-glucose dehydrogenase 遺伝子のクローニングおよび周辺遺伝子の解析に用いたプライマーを Table 3-2-3 に示す。

3-2-2. 無細胞抽出液の調製

L-glucose、D-glucose、D-galactose をそれぞれ単一炭素源とした最少液体培地 10 ml で培養した *Paracoccus* sp. 43P 株を O.D. 1.0 以上となってから全量集菌し、1 ml の超音波破碎用バッファー(100 mM Tris-HCl, 1 mM DTT, 10% glycerol, pH 7.5)で菌体を洗浄後、0.3 ml の同バッファーに懸濁し、氷冷しながら 15 分間超音波破碎を行った。超音波処理後の菌体を 20,400 x g で 15 分間遠心し、無細胞抽出液とした。

3-2-3. L-glucose を基質とした酵素活性の測定

1) 異性化反応の測定

180 μ l のバッファー(100 mM Tris-HCl、pH 7.5、10 mM L-glucose)に 20 μ l の無細胞抽出液を加え、2 時間 30°C でインキュベートし、Lobanok らの方法 (Lobanok et al. 1998) に従ってケトースの生成をシリカゲルプレート(Merck 社製)を用いた TLC によって検出した。

2) リン酸化反応の測定

180 μ l のバッファー(100 mM Tris-HCl、pH 7.5、10 mM ATP、1 mM $MgCl_2$ 、10 mM L-glucose)に 20 μ l の無細胞抽出液を加え、30°C で 2 時間インキュベートし、反応産物 5 μ l を Hemker らの条件にて TLC 展開後 (Hemker et al. 2001)、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬 (Anderson et al. 2000))を噴霧し、150°C で 10 分間加熱してスポットの生成を観察した。なお標品には D-glucose-6-phosphate (オリエンタル酵母)、D-glucose-1-phosphate (Sigma-Aldrich)を用いた。

3) NAD(P)⁺依存的デヒドロゲナーゼ活性の測定

150 μ l のバッファー(100 mM Tris-HCl、pH 7.5、1 mM NAD(P)⁺)に 10 μ l の無細胞抽出液を添加し、ついで 40 μ l の L-glucose 水溶液を加え (終濃度 28 mM)、NADH の生成に伴う 340 nm の吸光度の上昇を DU800 spectrophotometer (Beckman Coulter)にて測定した。活性は NADH の 340 nm におけるモル吸光係数 $\epsilon = 6220 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ より算出した。

3-2-4. L-glucose dehydrogenase の精製

1) 培養および無細胞抽出液の調製

200 ml の LB 液体培地中で 30°C、120 rpm で一晩培養した 43P 株の細胞を遠心分離により全量集菌し、1 L の D-galactose 培地に全量植菌して 24 時間培養を継続した。培養後の菌体を遠心分離により集菌後、氷冷した A バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 10% glycerol (v/v)) 30 ml に懸濁し、氷上で SONIFER 250 (Branson)による超音波破碎を 30 分間行った。破碎液を 27,400 x g、4°C、30 分間遠心した後、上清を 0.22 μ m のフィルターに通し、無細胞抽出液とした。

2) DEAE-cellulose 弱陰イオン交換クロマトグラフィー

上記無細胞抽出液を A バッファーで平衡化した DEAE cellulose DE52 (Whatman)を充填したエコノカラム(内径 2.5 cm, 高さ 15 cm)に全量充填した。流速は 0.8 ml min⁻¹とし、BioLogic LP システム (Bio-Rad)により操作を行った。カラム体積の 3 倍量の A バッファーを通液して非吸着タンパク質を溶出後、NaCl 濃度 0-500 mM のグラジエントにより吸着したタンパク質を溶出した。NaCl 濃度 80-120 mM で溶出した L-glucose dehydrogenase 活性をもつ画分をまとめてプールした。

3) Butyl-Toyopearl 疎水性相互作用クロマトグラフィー

上記活性画分に硫酸アンモニウムを終濃度 1.5 M となるように加えた。ついで 1.5 M 硫酸アンモニウムを含む A バッファーで平衡化した Butyl-Toyopearl 650M を充填したエコノカラム (内径 2.5 cm、高さ 15 cm) に活性画分を全量添加した。流速は 1.2 ml min^{-1} とし、BioLogic LP システム (Bio-Rad) により操作を行った。1.5 M 硫酸アンモニウムを含む A バッファー 120 ml を通液することで非吸着タンパク質を溶出後、硫酸アンモニウム濃度 1.5 M-0 M のグラジエントにより吸着したタンパク質を溶出した。硫酸アンモニウム濃度 0.6-0.5 M において溶出した L-glucose dehydrogenase 活性を有する画分をまとめてプールし、2 L の A バッファーで一晩透析して脱塩した。

4) MonoQ 5/50 GL 強陰イオン交換クロマトグラフィー

以降のクロマトグラフィーは AKTA FPLC システムを用いて行った。活性画分を A バッファーで平衡化した Mono Q 5/50 GL に全量添加し、10 ml の A バッファーで非吸着タンパク質を溶出後、0-250 mM の NaCl グラジエントにより吸着タンパク質を溶出した。流速は 1 ml min^{-1} とした。L-glucose dehydrogenase 活性を有するタンパク質は NaCl 濃度 150 mM で溶出した。活性画分を Amicon Ultra-0.5 mL 10 K (Milipore) を用いた限外ろ過によって濃縮した。

5) Superdex 200 10/300 GL ゲルろ過クロマトグラフィー

活性画分を 150 mM の NaCl を添加した A バッファーで平衡化した Superdex 200 10/300 GL に添加し、流速 0.5 ml min^{-1} で分画した。活性画分を集め、保存用バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM DTT, 50% glycerol) で透析し、 -20°C で保存した。

3-2-5. SDS-PAGE

Laemmli の方法に従った (Laemmli 1970)。12% アクリルアミドゲルを用いて 30 mA の定電流で泳動した。染色には Coomassie Brilliant Blue を用いた。

3-2-6. タンパク質濃度の定量

Bio-Rad 社の Protein assay kit を用い、取扱説明書に従って行った。検量線の作製には bovine serum albumin (Wako chemical) を用いた。

3-3-7. 活性染色

1) 無細胞抽出液の調製

3-2-2 に従って L-glucose を炭素源とした場合と D-galactose を炭素源とした場合のものを調製した。

2) Native PAGE

SDS を除いた 10%ポリアクリルアミドゲル、4°C、40 mA の定電流で電気泳動を行った。サンプルはそれぞれ 20 μ l ずつとして、還元剤を含まないローディングバッファーで熱処理をせずにアクリルアミドゲルにロードした。

3) 染色

40 分間泳動後、ゲルを蒸留水で洗浄した後、10 ml の活性染色液 (100 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM L-glucose, 0.25 mM nitro blue tetrazolium, 0.06 mM 1-methoxy-phenazine methosulfate, 5 mM NAD⁺) に浸漬し、室温で 15 分間反応させた。コントロールには、L-glucose を含まない染色液を用いた (Watanabe *et al.* 2006)。

3-2-8 LgdA のキネティックパラメーターの測定

NAD⁺濃度を 4 点 (1, 2, 3, 6 mM) と L-glucose 濃度を 7 点 (3.5, 7, 14, 28, 56, 112, 224 mM) とし、精製酵素の L-glucose に対する K_m , k_{cat} を測定した。反応系 200 μ l (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM MgCl₂, 2 μ g 精製酵素, 各濃度の NAD⁺および L-glucose) で 340 nm の吸光度をモニターして各点の活性を測定した。NAD⁺の飽和濃度は 8 mM、L-glucose の飽和濃度は 224 mM としてそれぞれのキネティックパラメーターを測定した。

得られた各基質濃度 x に対する v を y としてプロットし、Microcal Origin の非線形フィットツールによりミカエリスメンテンの式:

$$v = (V_{\max}[S]) / (K_m + [S]) \text{ (式 1)}$$

を用いてフィッティングし、 K_m , V_{\max} を求めた。ついで V_{\max} を反応に使用した酵素のモル濃度で除し、 k_{cat} とした。

3-2-9. 精製酵素の polyvinylidene difluoride membrane (PVDF 膜) への転写

精製酵素を 3-2-5 に従って電気泳動した後、A 液 (300 mM Tris, 5%メタノール), B 液 (25 mM Tris, 5%メタノール), C 液 (25 mM Tris, 40 mM 6-アミノカプロン酸, 5%メタノール) にそれぞれ浸したろ紙とアトー社製 PVDF 膜と SDS ゲルを重ね合わせ、ATTO Horizeblot system AE-6670 (ATTO, Tokyo, Japan) により 150 mA の定電流で 2 時間半 PVDF への転写を行い、CBB で染色した。転写されたマーカーを参考にして 40 kDa 付近のバンドを切り出した。

3-2-10. N 末端アミノ酸配列の同定

PVDF 膜に転写した精製酵素サンプルを北海道システムサイエンス社に送付し、エドマン分解法による N 末端アミノ酸配列解析を委託した。

3-2-11. PCR 産物のクローニング

ExTaq または GC-rich PCR system (Roche)を用いた場合は pGEM-T Easy cloning vector

system (Promega)を用いた。平滑末端を生じる DNA ポリメラーゼを用いた PCR 産物は、特に記載がない場合プライマーに付加した制限酵素サイトに対応した制限酵素で処理した後、pUC19 にクローニングした。形質転換にはエレクトロポレーション法を用い、宿主は *E. coli* DH10B を用いた。選択培地には LB 寒天培地を用い、用途に応じて抗生物質を以下の濃度で添加した: ampicillin, 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$; kanamycin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。青白選択を行う場合は培地に X-Gal を終濃度 0.004% (w/v)、IPTG を終濃度 0.2 mM それぞれ添加した。

3-2-12. プラスミドの抽出

プラスミドの抽出には小スケール (2-10 ml) の場合はアルカリ SDS 法、ラージスケール (50-200 ml) の場合は Fast Ion Plasmid Midi Kit (RBC BIOSCIENCE)を用いた。

3-2-13. L-glucose dehydrogenase をコードする遺伝子、*lgdA* のクローニング

1) 縮重プライマーを用いた PCR を介した *lgdA* 部分塩基配列の同定

43P 株より精製した L-glucose dehydrogenase の N 末端アミノ酸配列と高い相同性を示す、*P. denitrificans* PD1222 株由来の推定オキシドレダクターゼ、Pden_1680 のアミノ酸配列をもとにアライメントを作製した。アライメントで見出された内部アミノ酸保存領域および N 末端アミノ酸配列からそれぞれ作製した縮重プライマー、LGDH_midR、LGDH_NterF を用いて、2-2-6 に従って調製した 43P 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。PCR には ExTaq を使用し、アニーリング温度は 50 °C、伸長時間は 1 分とした。増幅した約 500 bp の DNA 断片を抽出、精製し、pGEM-T Easy vector system (Promega) を用いて pGEM-*lgdA*500 を得た。同プラスミドを鋳型とし、M13F、M13R プライマーを用いたシーケンスを行った。

2) サザンハイブリダイゼーション

pGEM-*lgdA*500 を *EcoRI* で処理し、*lgdA* の部分 DNA 断片を得た。得られた DNA 断片をウォーターバスで 95°C、15 分間処理して熱変性させた後、氷上で 10 分間静置して一本鎖とした。DIG DNA labeling kit (Roche)を用いて以下の反応液を調製し、37°Cで一晩反応させた。

| | |
|---------------------|------------------|
| Single stranded DNA | 16 μl |
| 10 X hexanucleotide | 2 μl |
| 10 X labeling mix | 2 μl |
| Klenow fragment | 1 μl |

反応産物をエタノール沈殿し、TE バッファーに再度懸濁してプローブとした。

43P 株のゲノム DNA を *EcoRI* で 3 時間処理し、0.8% アガロースゲルで電気泳動したあと、ゲルをアルカリ塩溶液 (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) に 30 分間浸し、DNA を一本鎖とした。ゲルを中和バッファー (0.5 M Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl) に 30 分間浸して中和した後、20 X

SSC で一晩 Hybond N⁺ (GE-Healthcare)に転写した。ナイロン膜を 2 X SSC で洗浄した後、ハイブリダイゼーション緩衝液 (5 X SSC, 0.1 % N-lauroyl sarcosine, 0.02 % SDS, 0.5 % ブロッキング試薬 (Roche))に浸し、68°C で 1 時間反応させた。次に上記で作製したプローブを加え、さらに 68°C で一晩反応させた。反応後の膜を 0.1 %SDS を含んだ 2 X SSC で 15 分間 2 回洗浄し、さらに 0.1 %SDS を含んだ 0.5 X SSC で 68°C で 15 分間 2 回洗浄した。膜をバッファー1 (100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.5 M NaCl)に 1 分間浸し、0.5 %ブロッキング試薬を加えた同バッファーに 30 分間浸した。再びバッファー1 に 1 分間浸して洗浄した後、DIG 抗体を含んだ同バッファーに 30 分間浸した。バッファー1 で洗浄後にバッファー2 (100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂ · 6H₂O)に 2 分間浸し、NBT-BCIP を加えて発色させた。

3) インバース PCR による *lgdA* 全長の解析及び周辺遺伝子の解析

43P 株のゲノム DNA 10 µg を 50 µl のスケールで *EcoRI* で一晩処理し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿後、30 µl の TE バッファーに溶解した。同様液 1 µl を 100 µl の系で T₄ DNA ligase (Promega)を用いて一晩処理し、セルフライゲーションを行った。ライゲーション後の溶液 1 µl を鋳型とし、プライマーセット、LGDH_invF、LGDH_invR を用いたインバース PCR 反応を行った (Ochman *et al.* 1988)。PCR 酵素は ExTaq を用い、アニーリング温度は 58°C、伸長時間は 4 分間とした。得られた約 3,500 bp の DNA 断片を pGEM-T Easy vector system によりクローニングした。上記のインバース PCR、サザンハイブリダイゼーション、シーケンス PCR、プライマーウォーキングを繰り返し、*lgdA* およびその周辺遺伝子の塩基配列、約 10 kb を解析した。

3-2-14. *lgdA* 発現用ベクターの構築

lgdA の開始コドンの前に *NdeI*、終始コドンの手前に *XhoI* サイトを付加したプライマーを作製し、43P 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応を行った。増幅の見られた 1,100 bp の断片を抽出した後、*NdeI*、*XhoI* で 2 時間制限酵素処理を行った。電気泳動、ゲル抽出後に同様の処理をした pET21a (+) と Ligation High (Toyobo)で 2 時間ライゲーション反応を行い、エレクトロポレーション法により *E. coli* DH10B 株に導入してアンピシリンで選択した。得られたプラスミドの塩基配列を確認し、目的のプラスミドを pETlgdA とした。ついで同プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)株にエレクトロポレーション法で導入した。

3-2-15. 43P*iolG* 発現用ベクターの構築

43P*iolG* の開始コドンの手前に *NdeI*、終始コドンの手前に *XhoI* サイトを付加したプライマーを作製し、43P 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR 反応を行った。増幅された約 1,000 bp の断片を 3-2-14 に従って pET21a (+)のマルチクローニングサイトにクローニングし pET43P*iolG* を得た。

3-2-16. LgdA-His₆ の精製

1) 培養

pETlgdA を保有した *E. coli* BL21 (DE3) 株を 100 mg/L のアンピシリンを含んだ LB 培地 5 ml で一晩培養し、100 ml の同培地に 1% 植菌して 37°C で O.D. = 0.5-0.8 となるまで培養した。培養液に IPTG を終濃度 0.1 mM となるように加え、さらに 30°C で 3 時間培養した。

2) 精製

培養後の菌体を 5,000 rpm で 10 分間遠心して集菌し、10 ml の破砕バッファー(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM イミダゾール, 0.5 M NaCl, 10%グリセロール)に懸濁して超音波により破砕した。破砕液を 15,000 rpm で 15 分間遠心し、上清を 0.22 µm のフィルターに通した後、Ni²⁺を配位させた後に破砕バッファーで平衡化した HiTrap Chelating HP (1 mL)に全量添加し、同バッファー10 ml で洗浄した。イミダゾール濃度を 500 mM とした破砕バッファー5 ml を通液して溶出し、保存用バッファー(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM DTT, 50 % glycerol (v/v))で一晩透析して-20°Cで保存した。

3-2-17. 43PIolG-His₆ の精製

pET43PIolG を保有した *E. coli* BL21 (DE3) 株を用いて、3-2-16 と同様に行った。

3-2-18. LgdA-His₆ のキネティックパラメーターの測定

反応液は 200 µl とし、デヒドロゲナーゼ活性測定のバッファーには 100 mM Tris-HCl, pH 8.0 を用いた。糖、イノシトールに対するキネティックパラメーターの測定に際しては NAD⁺ の濃度を 10 mM とし、糖またはイノシトールをそれぞれ以下に示す濃度で添加し、活性を測定した: L-glucose, 2, 4, 8, 16, 40, 80, 160, 300, 600 mM; L-allose, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 mM; L-xylose と D-glucose, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 375 mM; D-xylose, 15.625, 31.25, 62.5, 125, 250, 375 mM; L-xylose, 5, 10, 20, 40, 80, 200 mM; *myo*-inositol, 5, 10, 20, 40, 80, 160, 320, 500 mM; *scyllo*-inositol, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 mM; *scyllo*-quercitol, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 mM。

レダクターゼ活性測定のバッファーには 100 mM MES-KOH, pH 6.0 を用い、NADH の濃度を 0.2 mM とした。イノソースは以下に示す濃度で添加し、活性を測定した: *scyllo*-inosose, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 50 mM; L-*epi*-2-inosose, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 mM。

各データのフィッティングは 3-2-7 に従って Michaelis-Menten の式を用いた。*scyllo*-inosose を基質とした活性については基質阻害が見られたため以下に示す式を用いた:

$$v = V_{\max} [S] / (K_s + [S] + [S]^2 / K_{ss})$$

3-2-19. LgdA-His₆ の結晶化

東京農業大学 矢嶋俊介教授との共同研究により実施した。結晶構造に関する図の作製

は PyMOL を用いた。既知の結晶構造データの PDB ファイルは RSCB protein data bank (<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>)より 取得した。

3-2-20. 薄層クロマトグラフィー

担体には TLC silica gel 60 Aluminium sheet (Merck)を用いた。展開液には ethylacetate/methanol/acetic acid/water (6:1.5:1.5:1)を用いた。プレートをドライヤーで乾かした後、ジフェニルアミンアニリンリン酸試薬 (Anderson *et al.* 2000) を噴霧し、乾熱 150℃で 10 分間静置してスポットの形成を観察した。

3-2-21. LgdA の反応産物の精製

以下に示す組成の反応液; 100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 50 mM L-glucose, 2 mM NAD⁺, 100 mM pyruvate, 2 unit D-lactate dehydrogenase (オリエンタル酵母), 0.5 mg LgdA-His₆, 10 ml を 30℃で 8 時間インキュベートした後、200 mg の活性炭 (Wako)を加えて 15 分間 37℃で攪拌することで NAD⁺/NADH を活性炭に吸着させた。ついで反応液を 0.45 μm のフィルターに通液することで活性炭を除去した。さらに通過液を 5 g の DOWEX 1X8 (formate form, 200-400 mesh, Wako)を充填したカラムに通液し、10 ml の水で洗浄した。ついで 100 mM formate を通液し、LgdA 反応産物を溶出させた。溶出液を凍結乾燥により濃縮後、2 M NaOH により pH を 8-10 となるよう調製した。得られた濃縮液を分取用シリカゲルプレート (Merck)に全量線上にスポットし、展開液(ethylacetate/methanol/acetic acid/water (6:1.5:1.5:1))で 2 回展開した。シリカゲルプレートの両端約 2 cm をダイヤモンドカッターによって切り出し、ジフェニルアミン-アニリン-リン酸試薬を噴霧して加熱することで LgdA の反応産物に相当するピンク色のスポットの R_f 値を算出し、試薬を噴霧していない残りのシリカゲルプレートより LgdA 反応産物が存在すると推定される部分のシリカゲルをスパーテルを用いて切り出した。得られたシリカゲルから 10 ml の水を用いて 2 回抽出を行い、抽出物を凍結乾燥して LgdA 反応産物とした。

3-2-22. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

HPLC は LC-2000 plus system (Jasco) に検出器として示差屈折計 (RI-2031 plus, Jasco)、旋光度計 (OR-2090 plus, Jasco) を連結したものをを用いて行った。カラムは ICSep COREGEL 87H column (7.8 x 300 mm, Tokyo chemical industry) を用い、移動相 に 4 mM H₂SO₄、流速 0.6 ml min⁻¹、分析温度 30℃で解析を行った。

3-2-23. 核磁気共鳴スペクトル (NMR)

NMR 解析は筑波大学研究基盤総合センター分析部門の Avance-500 (500 MHz, Bruker)を用いて行った。測定は 25℃で行い、NMR 試料管には幅 5 mm、長さ 178 mm、製品名 508-UP-7 (東京化成工業)を用いた。溶媒には D₂O (東京化成工業)を用いて、すべての化学シフトはサ

ンプルに添加した 4,4-dimethyl-4-silapentane-1-sulfonic acid (0 ppm)を基準とした。各シグナルの帰属はデータベース(SDBS web)における sodium D-gluconate のスペクトルと比較して行った。

3-2-24. Potassium L-gluconate の調製

Moore らの方法 (Moore et al. 1940)に従って L-glucose をメタノールを溶媒としてヨウ素で酸化し、4% 水酸化カリウム-メタノール溶液を滴下することで析出する potassium L-gluconate を回収した。

Table 3-2-1. Modified L-glucose minimal medium

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| NH ₄ Cl | 1.08 g |
| KCl | 0.52 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.52 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.06 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2.12 g |
| L-glucose | 2.50 g |
| *Hutner's trace element solution | 2 ml |
| <hr/> | |
| | 1 L (pH 7.0) |

Table 3-2-2. D-galactose medium

| | |
|--------------------------------------|--------------|
| NH ₄ Cl | 1.08 g |
| KCl | 0.52 g |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 0.52 g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.06 g |
| K ₂ HPO ₄ | 2.12 g |
| D-galactose | 5.00 g |
| Yeast extract | 1.00 g |
| *Hutner's trace element solution | 2 ml |
| <hr/> | |
| | 1 L (pH 7.0) |

Table 3-2-3. Primers used in this chapter.

| Primer | Sequence (5'-3') |
|---|---------------------------|
| <i>Degenerate primers used for cloning of L-glucose dehydrogenase</i> | |
| LGDH_NterF | ATHGGNACNNGNTTYATGGG |
| LGDH_midR | GGRTCNGCCATRTARTCYTC |
| <i>Primers used for primer walking</i> | |
| M13F | TGT AAA ACG ACG GCC AGT |
| M13R | GCGGATAACAATTCACACAGG |
| LGDH_invF | GCCGAATGCGGTGCGACGTTGC |
| LGDH_invFII | GTCAATTTCTGAGGAATGATAT |
| LGDH_invR | GCGGTCGATCTGATCGCCGAAGG |
| LGDH_invRII | AAAGACTGGATCGCGCCGATCG |
| 43P1679_F | ATTGGTGCGAAACGCTGCAACC |
| 43P1678_invF | GGTCAAGGATGTGACCGGCGCG |
| 43P1678_invFII | CGGCTATGTCGCGCTGAAAAAGG |
| 43P1678_invFIII | GTTCTGGGCCAGCAGATCCTGA |
| 43P1678_invFIV | CGCTTTATCCCTTTAACCTGTG |
| 43P1678_invR | GGCGCGGTTTCACGTTCGTTTCAGC |
| 43P1678_invRII | CGGGCATATCCTCAAGCTGGAC |
| 43P1678_invRIII | CCTCGATTTGTCCGGTAAAGGC |
| 43P1677_R | GCTTCGATCATGCTGCCGGTGT |
| 43P1676_invF | GACGACCGGCTGGAGAATGC |
| 43P1676_invFII | ACGATCTGGTGCGCGGCTTT |
| 43P1676_invFIII | CTATGCCAAGACCAAGAAGC |
| 43P1676_invFIV | GCGGTTTCAGGACTTTACCA |
| 43P1676_invFV | GCTATAGCTGCATGGGGTACGA |
| 43P1676_invR | CGGTAGAAGATCAGCGGAAAGC |
| 43P1676_invRII | CGCACAGGCCGCGTTTCCCG |
| 43P1674_invF | AATGACTGCAAGGTCTGCGT |
| 43P1674_invFII | GGTGCAGGCATGAAGCTGTT |
| 43P1675_invR | AAAGTCGATCTGCGGCTGCT |
| 43P1675_invRII | CCCCATTTGATTTCTGCTG |
| 43P1675_invRIII | TATCTGCCCGATGGCAGCGA |

Primers used for construction of expression plasmids

| | |
|--------------|------------------------------------|
| LgdA_NdeF | CCGGGCATATGAGCAATGCTGAAAAAGCCCTC |
| LgdA_XhoR | CCGGGCTCGAGGAAATTGACGGGCTGGCCGGTCT |
| 43P1678_NdeF | CCGGGCATATGACCTTGAAAATCGGAGTGATC |
| 43P1678_XhoR | CCGGGCTCGAGGTCGTAAAGGGCGGGACGGGCGG |

第三節 L-グルコース代謝初段階反応の同定と L-グルコースデヒドロゲナーゼの精製

3-3-1. L-glucose 代謝初段階反応の同定

L-glucose 最少培地で培養した 43P 株の無細胞抽出液を用いて、L-glucose を基質とした酵素活性を検討した。TLC を用いたアッセイでは、L-glucose に対するリン酸化、異性化活性は検出されなかった。同様に NADH を補酵素とした還元活性も検出されなかったものの、NAD⁺を補酵素とした場合に明確な L-glucose dehydrogenase 活性 (L-GDH 活性) が観察された。この結果から、43P 株の L-glucose 代謝の初段階反応は、L-GDH による NAD⁺依存的な酸化反応であることが考えられた。また NADP⁺を補酵素とした場合には、同活性は検出されなかった (データ示さず)。

次に 43P 株の L-GDH 活性がどのような培養条件で誘導されるのかを検討するために、各種糖質を用いて 43P 株を培養し、L-GDH 活性について検討した。その結果、D-glucose、D-galactose を炭素源とした場合にも同程度の活性が検出された (Table 3-3-1) が、LB 培地を用いた場合は活性が検出されなかった (データ示さず)。

3-3-2. L-グルコースデヒドロゲナーゼの精製

次に L-GDH の精製を行うこととしたが、L-glucose は高価なため、L-glucose 最少培地で 43P 株を大量培養するのは困難であった。そこで、D-galactose を炭素源とした培地を用いて 43P 株を大量培養し、L-GDH 活性を有する酵素を SDS-PAGE 上で単一バンドとなるまで精製した (Fig. 3-3-1)。Table 3-3-2 に 1 L の培養液を出発材料とした場合の精製表を示す。なお L-GDH 活性は、精製の途中段階でも精製酵素を含む画分以外では検出されなかったもので、同活性を担う酵素は、D-galactose で培養した場合には今回精製した酵素以外には存在しないと考えられる。

さらに、精製酵素が 43P 株を L-glucose で培養した際に検出された L-GDH 活性の本体と同一であるかどうかを検討するために、精製酵素および D-galactose、L-glucose を炭素源として培養した 43P 株より調製した無細胞抽出液を用いて活性染色を行った。その結果、いずれのサンプルでも同一の移動度にバンドが形成された (Fig. 3-3-2)。このバンドは L-glucose を染色液に添加しなかった場合には生じなかったため、L-GDH 特異的なバンドであると結論した。

以上の結果より、D-galactose を炭素源として培養した 43P 株より精製した L-GDH は、L-glucose を単一炭素源として 43P 株を培養した際に発現するものと同一であることが示された。

3-3-3. キネティックパラメーターの測定

精製した L-GDH の L-glucose に対するキネティックパラメーターを測定した結果、 k_{cat} が 710 min^{-1} 、 K_m が $44.4 \pm 6.3 \text{ mM}$ であった。

Table 3-3-1. L-GDH activity on cell-free extract from *Paracoccus* sp. 43P.

| Cultivated carbon source | Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
|--------------------------|---|
| L-glucose | 0.054 |
| D-glucose | 0.025 |
| D-galactose | 0.051 |

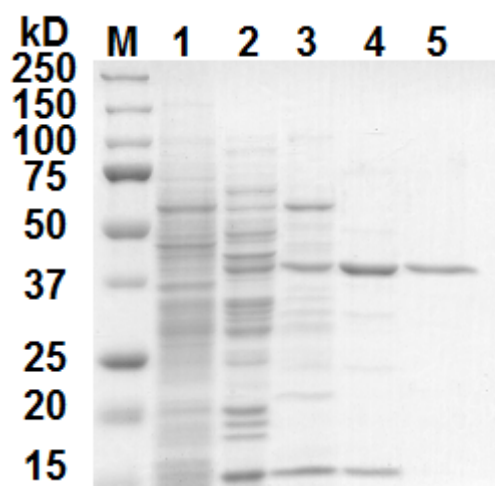


Figure 3-3-1. SDS-PAGE of purification steps of L-GDH.

Lanes M, molecular marker; Lane 1, cell-free extracts; 2, after DEAE-cellulose; 3, after Butyl-Toyopearl; 4, after Mono Q 5/50 GL; and 5, after Superdex 200 10/300 GL chromatography.

Table 3-3-2. Purification of L-GDH.

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$) | Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) | Yield (%) |
|---------------------|-----------------------|--|---|--------------|
| Cell-free extract | 734 | 33.1 | 0.05 | 100 |
| DEAE-cellulose | 117 | 22.6 | 0.19 | 68.2 |
| Butyl Toyopearl | 8.53 | 20.6 | 2.42 | 62.8 |
| Mono Q 5/50 | 1.51 | 4.86 | 3.21 | 14.7 |
| Superdex 200 10/300 | 0.21 | 0.982 | 4.71 | 3.0 |

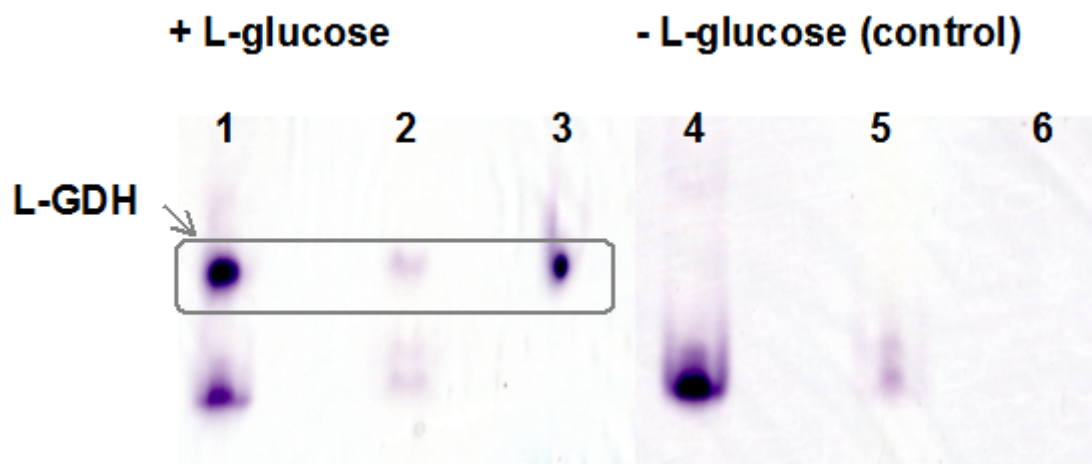


Figure 3-3-2. Zymogram staining of L-GDH in the cell-free extract from *Paracoccus* sp. 43P. Cell-free extracts and the purified enzyme were separated on 10 % polyacrylamide gel, and formation of NADH was visualized using nitro blue tetrazolium as formazan dye in the presence (lane 1-3) or the absence (lane 4-6) of 100 mM L-glucose. Lane 1 and 4, cell-free extract from strain 43P cultivated with L-glucose; lane 2 and 5, cell-free extract from strain 43P cultivated with D-galactose; lane 3 and 6, purified L-GDH.

第四節 *lgdA* のクローニング

3-4-1. L-GDH の N 末端アミノ酸配列の同定

精製酵素を SDS-PAGE 後、PVDF 膜に転写し、エドマン分解法により N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、本酵素の N 末端 19 残基のアミノ酸配列は、SNAEKALGVALLIGTGFMGK であった。

3-4-2. データベース解析とアライメントによる内部アミノ酸保存領域の推定

L-GDH の N 末端アミノ酸配列を BLAST 検索に供したところ、ゲノム配列が明らかとなっている *P. denitrificans* PD1222 株の推定オキシドレダクターゼ、Pden_1680 と 80%の相同性を示した。そこで Pden_1680 のアミノ酸配列全長をデータベース検索に供し、相同性が見られるタンパク質とアライメントを作製したところ、Pden_1680 のアミノ酸配列における 165-171 番目のアミノ酸残基が、他のタンパク質においても保存されていることを見出した (Fig. 3-4-1)。

3-4-3. 縮重プライマーを用いた PCR による L-GDH 遺伝子 (*lgdA*) の ORF 5'側領域の取得

精製酵素の N 末端アミノ酸配列及びアライメントより得られた保存アミノ酸配列から縮重プライマーセットを設計し、43P 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った結果、約 500 bp の DNA 断片の増幅が認められた。増幅断片を pGEM-T Easy ベクターにクローニングした後、配列を解析した結果、得られた塩基配列は Pden_1680 の ORF 中の 5'側約 500 bp と 84%の相同性を示した。

3-4-4. インバース PCR による *lgdA* 全長のクローニング

得られた *lgdA* ORF の部分塩基配列をもとに外向きのプライマーセットを作製し、*EcoRI* で処理後セルフライゲーションを行った 43P 株のゲノム DNA を鋳型としたインバース PCR を行った。その結果サザンハイブリダイゼーションの結果 (Fig. 3-4-2) から予想された約 3,500 bp の DNA 断片の増幅が観察されたので、同 DNA 断片の両末端部分の配列を解析した結果、*lgdA* ORF 全長に相当する 1,119 bp の配列情報を取得することに成功した。

3-4-5. *lgdA* 周辺遺伝子の解析

インバース PCR、プライマーウォーキングを繰り返し、*lgdA* の周辺にどのような遺伝子が存在するのか解析した。その結果、*lgdA* の下流に存在する遺伝子は、inositol 代謝関連遺伝子と高い相同性を有していた (Table 3-4-1)。また、ゲノム配列が明らかとなっている *P. denitrificans* PD1222 株にも 43P 株と同様の遺伝子クラスターの存在が確認された (Fig. 3-4-3) が、*P. denitrificans* PD1222 株における Pden_1673 に相当するオルソログを 43P 株は有していなかった。

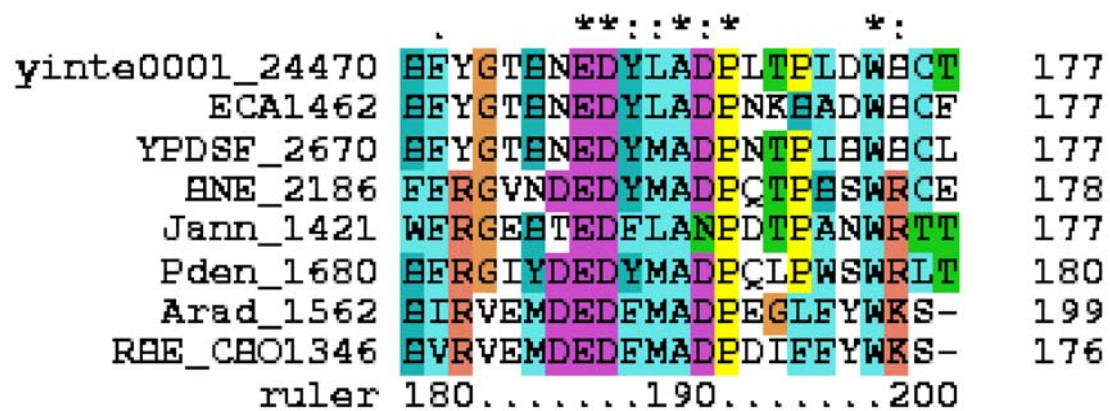


Figure 3-4-1. Conserved amino acid sequences of Pden_1680 and its orthologs. Conserved amino acids are shaded. Asterisks and colons indicate identical and positive amino acid residues, respectively. Pden_1680, *Paracoccus denitrificans* PD1222; Yinte0001_24470, *Yersinia intermedia* ATCC29909, ECA1462; *Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica* SCRI1043, YPDSF_2670, *Yersinia petis* Angola, HNE_2186; *Hyphomonas neptunium* ATCC15444, Jann_1421; *Jannaschia* sp. CCS1, Arad_1562; *Agrobacterium radiobacter* K84, and RHE_CH01346; *Rhizobium etli* CFN42.

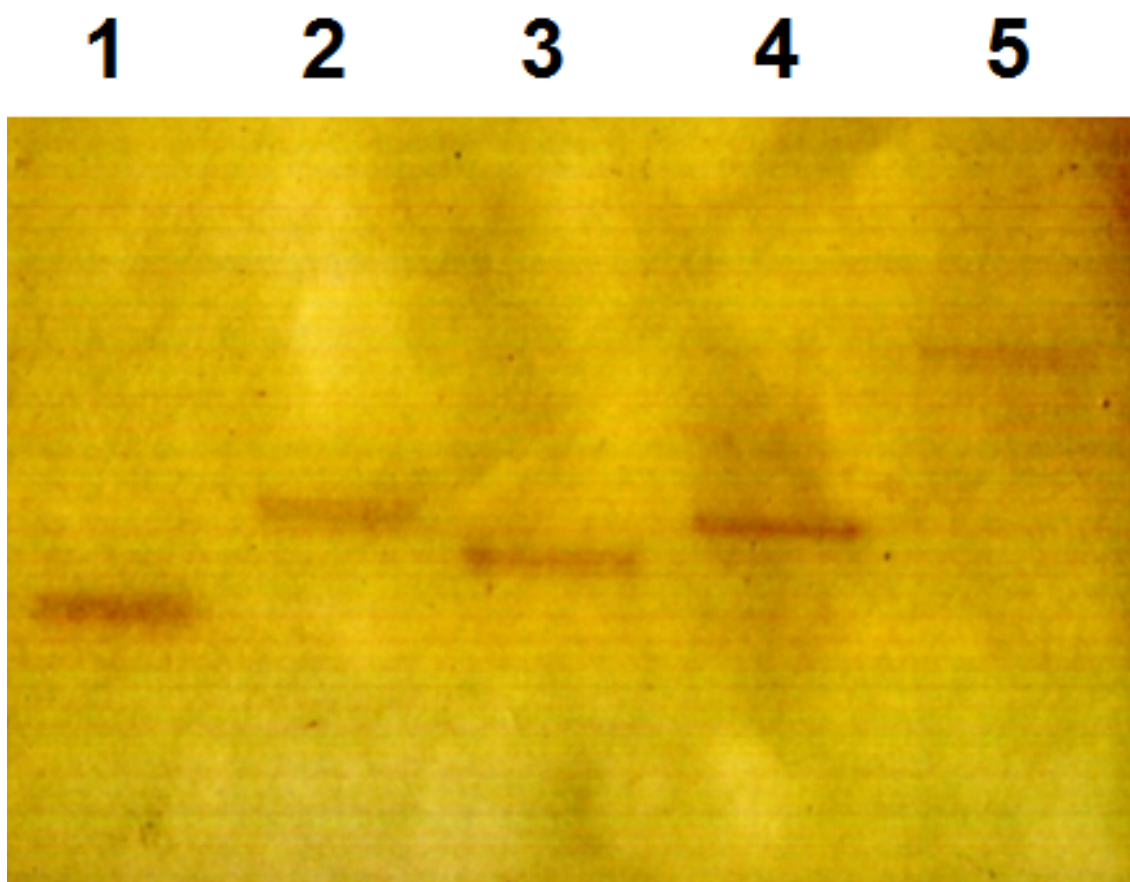


Figure 3-4-2. Southern hybridization analysis.

EcoRI-digested fragment of pGEM-lgdA500 was labeled with DIG DNA labeling kit, and used as a probe DNA. Genomic DNA of *Paracoccus* sp. 43P was digested with the indicated restriction enzymes; lane 1, *EcoRI*; 2, *PstI*; 3, *Bam*HI and *Bgl*II; 4, *Eco*T22 and *PstI*; and 5, *Xho*I and *Sal*I.

Table 3-4-1. Predicted functions of genes located in the cluster containing *lgdA*.

| <i>Orf</i> | Predicted function |
|--------------|---|
| <i>lgdA</i> | Putative oxidoreductase |
| <i>orf 1</i> | Xylose isomerase domain protein (IolH) |
| <i>orf 2</i> | Myo-inositol-2-dehydrogenase (IolG) |
| <i>orf 3</i> | Inosose isomerase (IolI) |
| <i>orf 4</i> | 5-dehydro-2-deoxygluconokinase (IolC) |
| <i>orf 5</i> | Trihydroxycyclohexane-1,2-dione hydrolase |
| <i>orf 6</i> | Inosose dehydratase (IolE) |
| <i>orf 7</i> | 5-deoxy-glucuronate isomerase (IolD) |

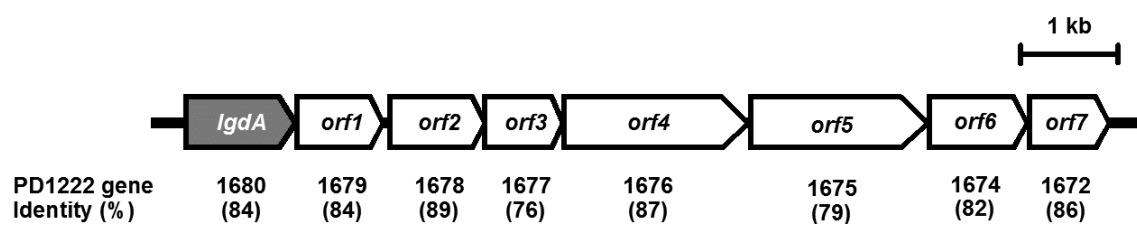


Figure 3-4-3. Gene organization of the cluster containing *lgdA*.

Sequence identities to the corresponding *P. denitrificans* PD1222 genes are shown in parentheses.

第五節 LgdA の酵素学的諸性質の解析

3-5-1. LgdA-His₆ の調製

lgdA ORF を PCR 増幅して得た断片を pET21a (+) の *Nde*I, *Xho*I サイトにクローニングし、pET-*lgdA* を作製した。C 末端に His タグを付加して発現させ、HisTrap カラムにより精製した。IPTG 濃度を上げすぎると菌体の増殖が悪化する傾向が観察された (データ示さず) ため、IPTG 濃度は 0.2 mM とした。LgdA-His₆ は HisTrap カラムに強く吸着し、100 mM imidazole を含むバッファーで洗浄した後 500 mM imidazole を含むバッファーで溶出させることで SDS-PAGE 上単一バンドに精製することができた (Fig. 3-5-1)。

3-5-2. LgdA-His₆ を用いたキネティックパラメーターの測定

LgdA-His₆ を用いてキネティックパラメーターの測定を行った。この際、*lgdA* の周辺に推定 inositol 代謝関連遺伝子が存在することが示されたことから、ペントース、ヘキソースだけではなく inositol 異性体についても基質として用い、NAD⁺ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性についてキネティックパラメーターを測定した。その結果 LgdA-His₆ は L-glucose を基質とした場合、精製酵素と同程度の NAD⁺ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性を示し、NADP⁺ を補酵素とした活性は検出されなかった。また LgdA は L-xylose, L-allose, D-glucose, D-xylose, *myo*-inositol, *scyllo*-inositol, *scyllo*-quercitol を基質としたデヒドロゲナーゼ活性も有しており、*scyllo*-inositol を基質とした活性が最も強かった (Table 3-5-1)。D-galactose, L-galactose, D-mannose, L-mannose, D-arabinose, L-arabinose, L-fucose, L-rhamnose, *epi*-inositol, D-*chiro*-inositol, L-*chiro*-inositol を基質とした活性は検出されなかった。以上の結果から LgdA は 6 員環構造を有しており、エクアトリアルな水酸基を多く含む化合物をデヒドロゲナーゼ活性の基質として認識していることが示唆された (Fig. 3-5-2)。次いで NADH を補酵素としたレダクターゼ活性についても検討したところ、*scyllo*-inosose、L-*epi*-2-inosose を基質としたレダクターゼ活性が検出された一方で、L-glucose、D-glucose の 1 位の水酸基が酸化された L-glucono-1,5-lactone、D-glucono-1,5-lactone をそれぞれ基質としたレダクターゼ活性は検出されなかった (Table 3-5-2)。また *scyllo*-inosose を基質とした活性については基質阻害が観察された (Fig. 3-5-3)。

3-5-3. 結晶構造解析と既知の結晶構造との比較

東京農業大学 矢嶋俊介教授との共同研究により LgdA と NAD⁺、L-glucose の酵素基質複合体の結晶構造が明らかとなった。アライメント解析 (Fig. 3-5-4) から LgdA で酸塩基触媒として機能すると推定される Lys106、His195 の側鎖が L-glucose の 1 位の水酸基に近接している (Fig. 3-5-5) ことから、LgdA は L-glucose の 1 位の水酸基を酸化していることが予想された。また LgdA は鎖状の L-glucose ではなくピラノース構造をとった L-glucose を基質として認識していることが示唆された。さらに LgdA が属する Gfo/Idh/MocA ファミリーのタン

パク質で酵素基質複合体構造が明らかとなっている *Bacillus subtilis* 由来の *myo*-inositol-2-dehydrogenase (BsIolG) の結晶構造 (PDBID: 3NT4) と比較を行った (Fig. 3-5-6)。その結果 BsIolG で酸塩基触媒として機能することが知られている Lys97、Asp172、His176 に相当するアミノ酸残基が LgdA においても Lys106、Asp191、His195 として保存されており、両結晶構造でその位置関係には明確な共通性が見られた。また補酵素である NAD⁺ の結合様式についても 2 つの結晶構造は非常に良く似ていた。一方で基質の結合様式に注目すると、BsIolG では基質である *myo*-inositol の 6 員環が NAD⁺ のピリジン環に対して垂直に結合しているのに対して、LgdA では L-glucose の 6 員環が NAD⁺ のピリジン環に対して平行に結合していることが明らかとなった。このことから、LgdA は既知の Gfo/Idh/MocA ファミリータンパク質とは異なるユニークな基質認識メカニズムを有していることが示唆された。

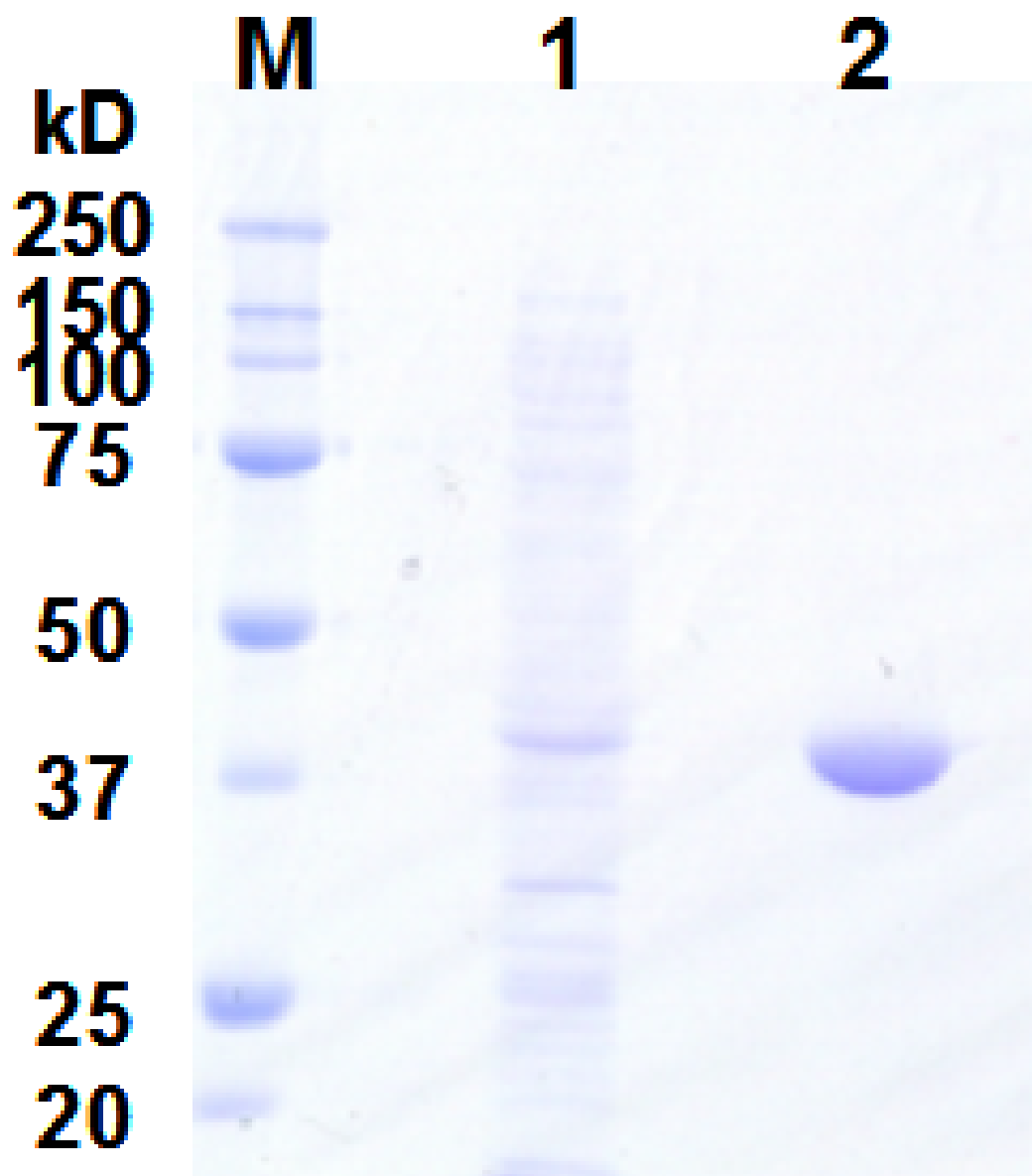


Figure 3-5-1. SDS-PAGE of LgdA-His₆.

Lanes M, molecular marker; Lane 1, cell-free extracts of *E. coli* BL21 harboring pET-lgdA; 2, after HisTrap HP chromatography.

Table 3-5-1. Kinetic parameters of dehydrogenase reaction of LgdA with various substrates.

| Substrate | K_m (mM) | k_{cat} (min^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$) |
|--------------------------|----------------|---------------------------------|--|
| L-glucose | 59.7 ± 5.7 | 1040 ± 28 | 17.4 |
| D-glucose | 88.7 ± 8.3 | 215 ± 36 | 2.41 |
| L-xylose | 31.9 ± 4.9 | 702 ± 104 | 22.2 |
| D-xylose | 168 ± 2.2 | 312 ± 20 | 1.90 |
| L-allose | 52.5 ± 2.8 | 170 ± 3 | 3.24 |
| <i>scyllo</i> -inositol | 3.70 ± 0.4 | 705 ± 12 | 190 |
| <i>myo</i> -inositol | 53.3 ± 8.6 | 572 ± 30 | 10.7 |
| <i>scyllo</i> -quercitol | 9.85 ± 0.8 | 495 ± 12 | 50.3 |

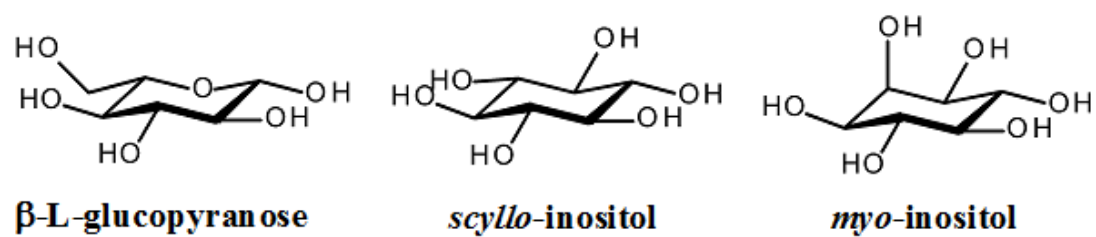


Fig. 3-5-2. Configuration of LgdA substrates for NAD^+ dependent dehydrogenase reaction.

Table 3-5-2. Kinetic parameters of reductase reaction of LgdA with various substrates.

| Substrate | K_m (mM) | K_{ss} (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹) |
|--------------------------|-----------------------------|-----------------|--------------------------------|---|
| <i>scyllo</i> -inosose | 0.356 ± 0.038 (K_s) | 5.93 ± 0.63 | 6750 ± 2 | 19000 |
| L- <i>epi</i> -2-inosose | 40.3 ± 2.2 | - | 4500 ± 280 | 113 |
| L-glucono-1,5-lactone | N.D. | - | - | - |
| D-glucono-1,5-lactone | N.D. | - | - | - |

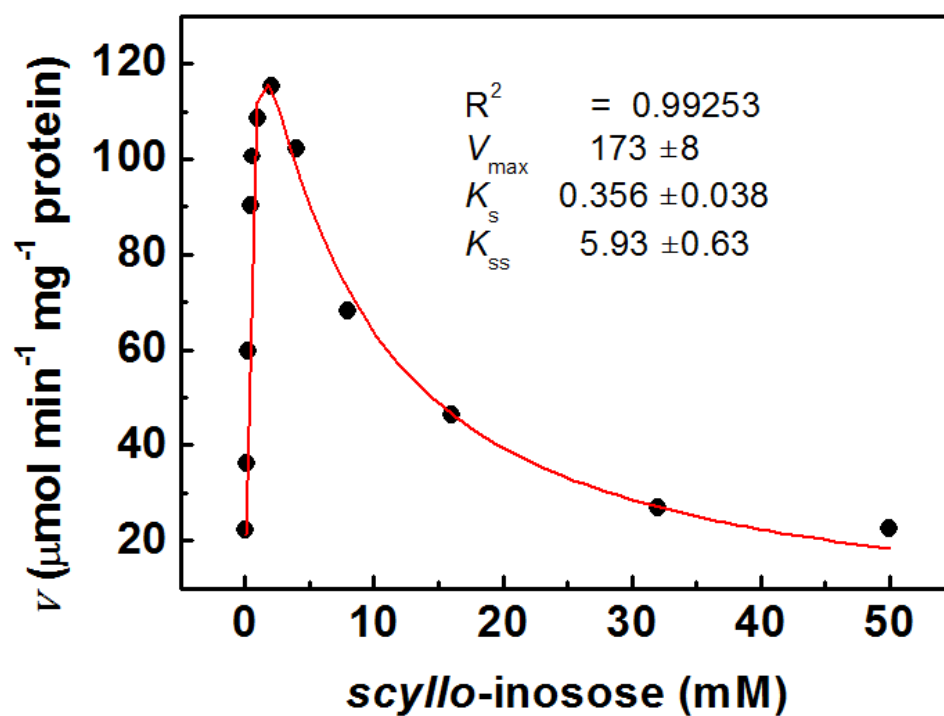


Fig. 3-5-3. Substrate inhibition of *scyllo*-inosose against reductase reaction of LgdA.

NADH-dependent *scyllo*-inosose reductase activity was measured at various concentration of *scyllo*-inosose (closed circles). Red line indicates the result of fitting with the Michaelis-Menten equation considering substrate inhibition, generated by Origin 6.0J.

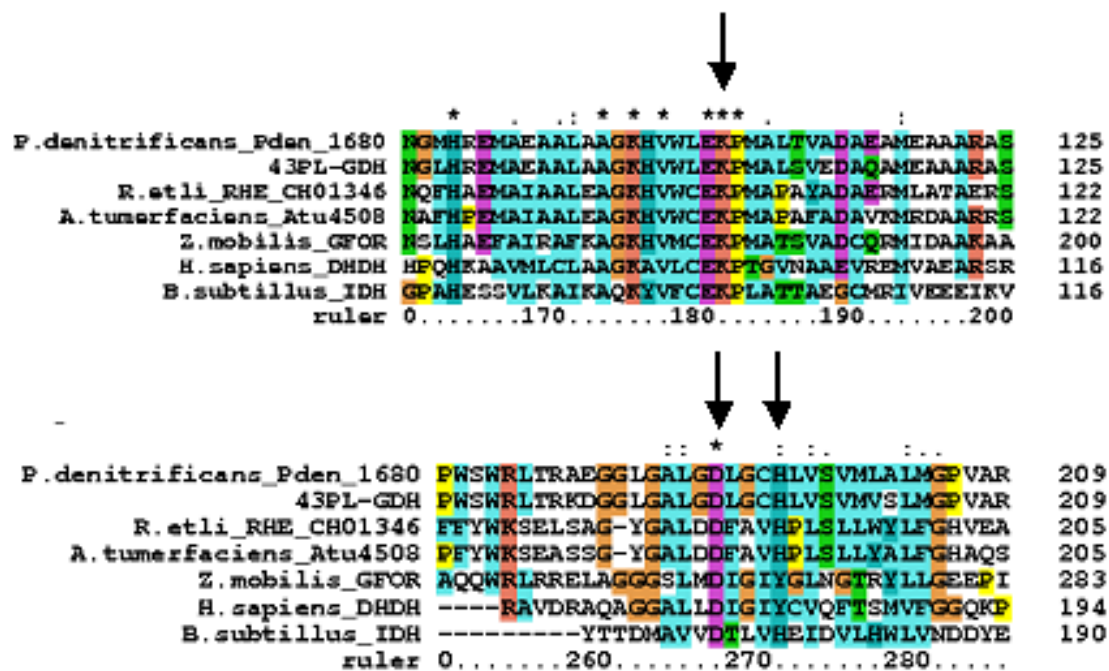


Fig. 3-5-4. Conserved amino acid residues in Gfo/Idh/MocA family proteins.

Amino acid sequence of LgdA (43PL-GDH) was aligned with those of several Gfo/Idh/MocA family proteins of following accession numbers; *P. denitrificans*_Pden_1680, YP_915473; *R. etli*_CH01346, YP_468877; *A. tumefaciens*_Atu_4508, NP_356149; *Z. mobilis*_GFOR, YP_162424; *H. sapiens*_DHDH, NP_055290; *B. subtilis*_IDH, NP_391849. Conserved amino acids are shaded. Asterisks and colons indicate identical and similar amino acid residues, respectively. Catalytic Lys, Asp, and His/Tyr residues are indicated with arrows.

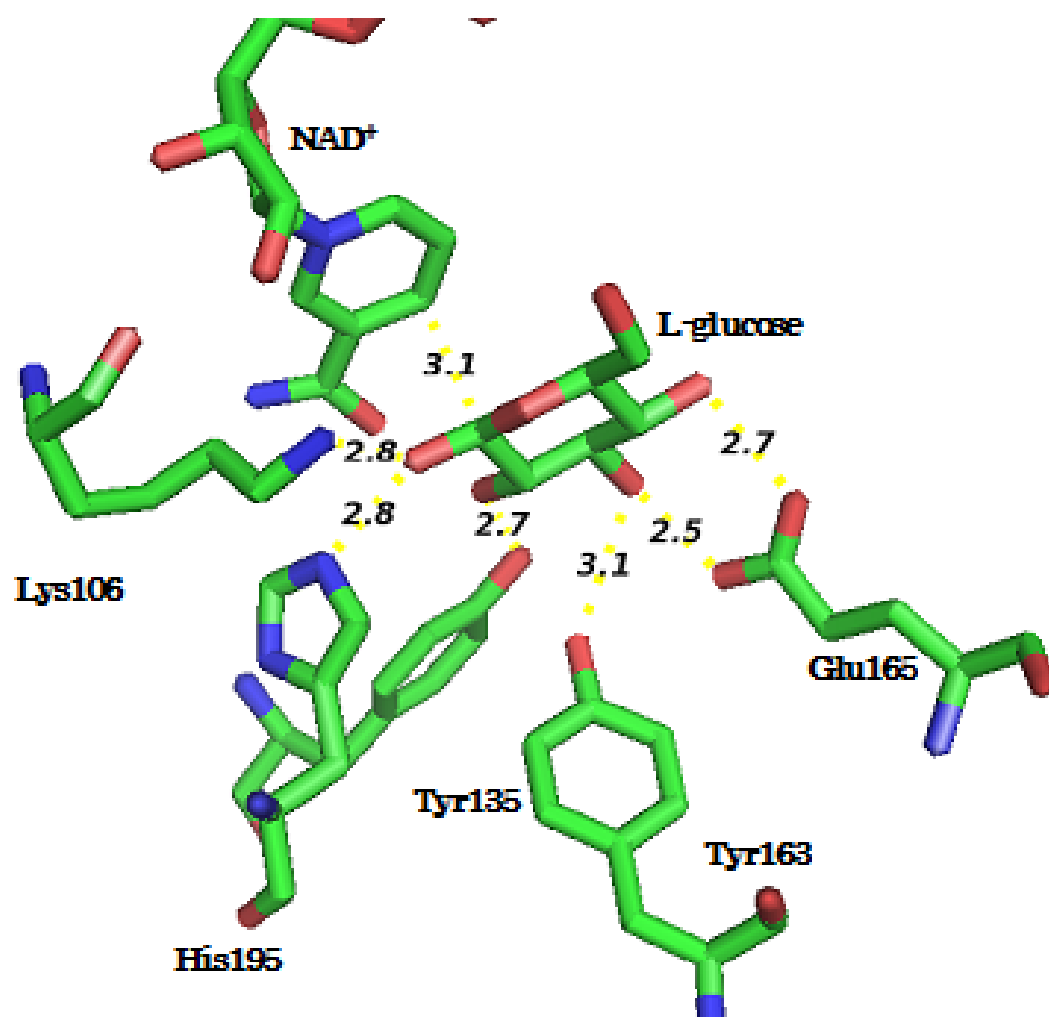


Fig. 3-5-5. Stick representation of NAD⁺ and L-glucose binding site of LgdA. Distance between side chains of amino acids of LgdA and hydroxyl groups of L-glucose are shown in angstrom (Å).

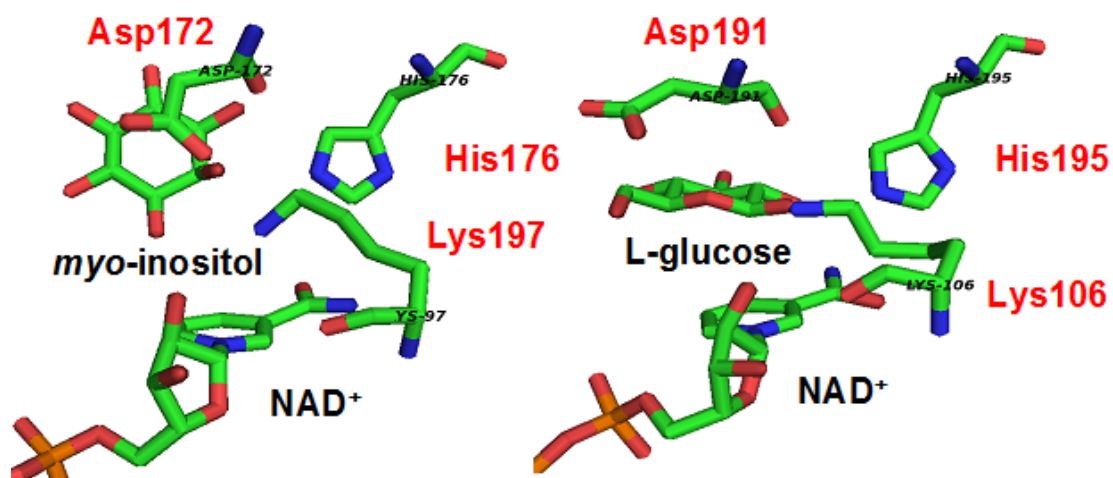


Fig. 3-5-6. Comparison of substrate binding sties of BslolG (right) and LgdA (left). PDB file of BslolG-NAD⁺-*myo*-inositol complex was obtained from protein data bank (PDB accession code, 3NT4).

第六節 *lgdA* を含む遺伝子クラスターの機能解析

3-6-1. 43PIolG の機能解析

lgdA の下流に存在した *myo*-inositol-2-dehydrogenase (IolG) と相同性が見られる遺伝子 (43PIolG; Fig. 3-4-3 における *orf2*) を pET21a (+) の *Nde*I-*Xho*I サイトにクローニングし、*E. coli* BL21 株を宿主として発現させ、機能解析を行った。培養、精製ともに *LgdA* と同様の方法で SDS-PAGE 上において単一バンドに精製することができた (Fig. 3-6-1)。43PIolG は *myo*-inositol を基質として NAD^+ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性、 NADH を補酵素として *scyllo*-inosose を基質としたレダクターゼ活性を有していた (Table 3-6-1)。その一方で、*scyllo*-inositol、*L*-glucose を基質としたデヒドロゲナーゼ活性は検出されなかった。

3-6-2. *myo*-inositol を単一炭素源とした際の *L*-glucose dehydrogenase 活性の発現

myo-inositol を単一炭素源として培養した 43P 株の無細胞抽出液中の *L*-glucose dehydrogenase 活性を測定したところ、*L*-glucose、*D*-glucose、*D*-galactose を単一炭素源とした場合と比べ、明らかに強い *L*-glucose dehydrogenase 活性が検出された (Table 3-6-2)。

以上の結果から *lgdA* を含む遺伝子クラスターは、*L*-glucose 代謝特異的なものではなく、本来は inositol 異性体の分解、資化に関わるものであることが推察された。

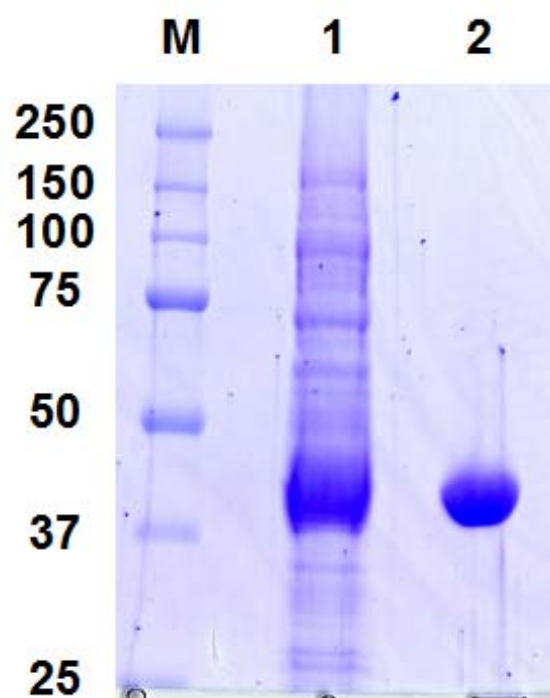


Fig. 3-6-1. SDS-PAGE of 43PiolG-His₆.

Lanes M, molecular marker; 1, cell-free extract of *E. coli* BL21 harboring pET-43PiolG; 2, after HisTrap HP.

Table 3-6-1. Kinetic parameter of 43PIolG-His₆.

| Substrate | Cofactor | K_m (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹) |
|-------------------------|------------------|------------|--------------------------------|---|
| <i>myo</i> -inositol | NAD ⁺ | 4.8 ± 0.3 | 937 ± 14 | 195 |
| <i>scyllo</i> -inositol | NAD ⁺ | N.D. | - | - |
| L-glucose | NAD ⁺ | N.D. | - | - |
| <i>scyllo</i> -inosose | NADH | 3.9 ± 0.4 | 18700 ± 492 | 4800 |

Table 3-6-2. L-glucose dehydrogenase activity on cell free extract from *Paracoccus* sp. 43P

| Cultivated carbon source | Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
|--------------------------|---|
| L-glucose | 0.054 |
| D-glucose | 0.025 |
| D-galactose | 0.051 |
| <i>myo</i> -inositol | 0.184 |

第七節 LgdA の L-glucose を基質とした反応産物の同定

LgdA の L-glucose を基質とした反応産物を精製し、NMR スペクトルを測定したところ、LgdA の反応産物は potassium D-gluconate と同様の ^1H 、 ^{13}C NMR スペクトルを有していた (Table 3-7-1)。さらに HPLC 解析を行った結果、LgdA 反応産物は L-glucose を I_2 酸化により化学的に合成した potassium L-gluconate と、示差屈折計による検出では同一のリテンションタイムを示し、また旋光性に関しても potassium L-gluconate と同様に左旋光性を示した (Figure 3-7-1)。以上の結果から LgdA の反応産物は L-gluconate であることが示された。

Table 3-7-1. ¹H and ¹³C chemical shifts of the LgdA reaction product.

| | δ (ppm) | | | δ (ppm) |
|--------|---------------------------|--------|----|-----------------|
| H2 | 4.128 (4.116) | 1H, d | C1 | 181.33 (181.30) |
| H3 | 4.027 (4.019) | 1H, dd | C2 | 76.79 (76.76) |
| H4, H5 | 3.781-3.745 (3.775-3.736) | 2H, m | C3 | 75.26 (75.27) |
| H6 | 3.621 (3.621) | 1H, m | C4 | 73.91 (73.90) |
| H6' | 3.813 (3.812) | 1H, dd | C5 | 73.65 (73.67) |
| | | | C6 | 65.33 (65.32) |

*Chemical shifts of the authentic potassium D-gluconate are shown in bracket

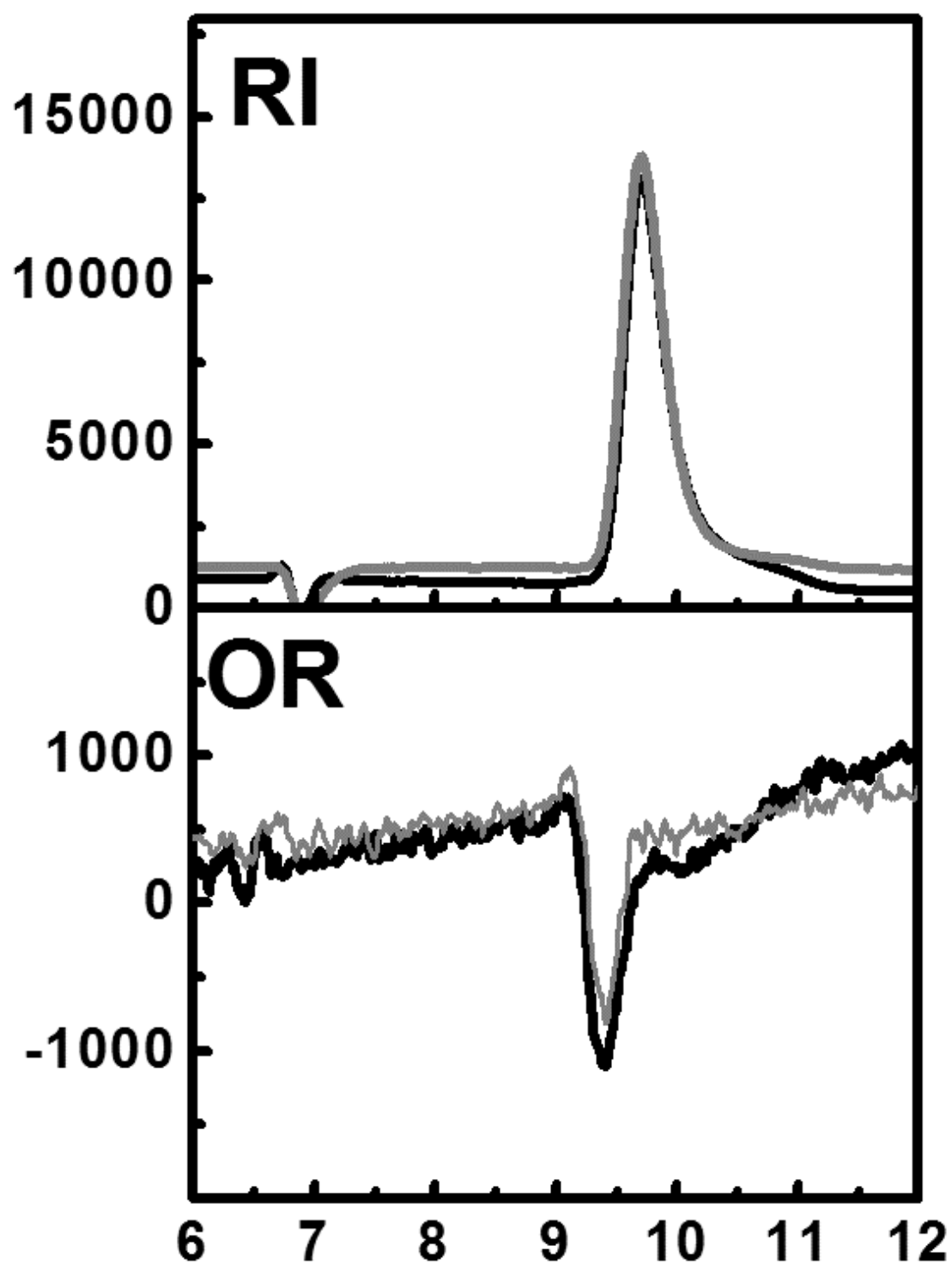


Figure 3-7-1. HPLC analysis of the LgdA reaction product detected by a refractive index (RI) and a chiral detector (OR).

Black and gray lines indicate chromatograms of reaction product and authentic L-gluconate, respectively.

第八節 まとめと考察

本章では、*Paracoccus* sp. 43P 株における L-glucose 代謝経路の初段階反応を担う酵素、L-glucose dehydrogenase (LgdA) の精製、遺伝子クローニング及び酵素学的検討を行った。L-glucose を基質として、NAD(P)⁺ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素としては、Sasajima らが *Burkholderia caryophili* より精製した D-threo-aldose-1-dehydrogenase が報告されているが、同酵素が aldo/keto reductase ファミリーに属するのに対して、LgdA は Gfo/Idh/MocA ファミリーに属しており、分子系統的に全く異なるものである。また、この酵素が L-glucose 以外に D-arabinose、L-fucose を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を触媒するのに対して、LgdA はこれらの単糖を基質とした活性は有していない。以上の点から、LgdA は新規な L-glucose dehydrogenase 活性を有する酵素であると結論される。

lgdA は 43P 株における推定 inositol 代謝関連遺伝子クラスターに含まれており、リコンビナント酵素のキネティックパラメーターからも L-glucose よりむしろ *scyllo*-inositol を基質とした活性のほうが強い。また実際に *myo*-inositol を単一炭素源とした培養の方が、L-glucose を含む他の炭素源で培養した場合よりも明らかに高い L-GDH 活性を示したことから、*lgdA* は本来 inositol 異性体、特に *scyllo*-inositol の分解、資化を担う酵素遺伝子であることが推察される。しかしながら 43P 株の特徴として、D-glucose、D-galactose、L-glucose といった inositol 以外の炭素源を用いた場合でも、無細胞抽出液中に比較的高い L-GDH 活性が観察されることから、*lgdA* の発現量は炭素源に関わらず比較的高いレベルにあるといえる。そのため 43P 株においては、本来 inositol 代謝に関わる LgdA が L-GDH として L-glucose 代謝にも寄与することが推察される。

Inositol を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素が、単糖を基質とした反応を触媒する例は LgdA に限らず、BsIolG でも報告されており、同酵素は *myo*-inositol、D-*chiro*-inositol (Yoshida *et al.* 2008) のほかに、D-glucose、D-xylose を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を有していることが知られている。アルドヘキソース、アルドペントースは水溶液中において α ピラノース、 β ピラノース構造をとりうることは知られているが、*myo*-inositol におけるアキシシャル位の水酸基を酸化する IolG が基質として認識するのは、 α -D-xylose、 α -D-glucose といった 1 位の水酸基がアキシシャル位となる α アノマーである (Ramaley *et al.* 1979)。一方で LgdA はすべての水酸基がエクアトリアル位となる *scyllo*-inositol を基質とした活性を有していることから、エクアトリアル位の水酸基を酸化するデヒドロゲナーゼである。従って LgdA が基質として認識する単糖は、1 位の水酸基がエクアトリアル位となる β アノマーであると推察される。

scyllo-inositol を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素としては、*B. subtilis* 由来の IolX、IolW が知られている (Morinaga *et al.* 2010)。IolX、IolW は LgdA と同じ Gfo/Idh/MocA ファミリーに属しているものの、LgdA とのアミノ酸配列相同性はそれぞれ 26.3%、22.1% という低い値である。また神戸大学の吉田先生に IolX と IolW の L-glucose を基質とした活

性について解析を依頼した結果、IolX は L-glucose を基質とした活性を有しておらず、IolW についても LgdA の 50 分の 1 程度の L-glucose dehydrogenase 活性($k_{\text{cat}}/K_m = 0.37 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$)しか検出されなかった。以上の点から、LgdA は *scyllo*-inositol dehydrogenase としても新規性の高いものであり、同酵素が比較的高い L-GDH 活性を有している点はユニークな特徴である。

様々な単糖を用いた LgdA の基質特異性の解析から、同酵素は L-glucose だけではなく、その鏡像異性体、D-glucose を基質としたデヒドロゲナーゼ活性をも有していることが明らかとなった。一般的に酵素では、複数のアミノ酸が水素結合やイオン結合・疎水結合を介して、基質となる化合物を立体的に認識して作用するため、2 つの鏡像異性体のうち片方のみに対して作用しうるものである。それでは、LgdA はどのような機構で 2 つの鏡像異性体双方に対して作用するのであろうか。LgdA の基質となる inositol、単糖の構造を比較すると、すべての基質は六員環構造に多くの水酸基を含んだものであることが分かる。また、その水酸基の立体配置に注目すると、ほとんどの水酸基がエクアトリアル位をとっている。すなわち、LgdA は偏平な構造を有した六員環化合物を基質として認識している。酵素がこのように偏平な化合物を認識する場合、その選択性は立体的なものというより、むしろ 2 次元的なものに近くなるであろう。また LgdA の本来の基質であると推測される *scyllo*-inositol は、対称面を有するメソ体であり、鏡像異性体は存在しない。すなわち、LgdA は本来の機能という面では鏡像異性体を区別する機構を獲得する必要性がなかったといえる。このような背景から、LgdA はすべての水酸基がエクアトリアル位をとる 2 つの鏡像異性体、 β -L-glucose と β -D-glucose の違いを厳密には認識できず、両者に対して作用するというユニークな性質を持つに至ったことが考えられる。現在までのところ、LgdA-NAD⁺-L-glucose の酵素基質複合体に関しては分解能の高い結晶構造が東京農業大学の矢嶋俊介教授らのグループにより得られているが、LgdA-NAD⁺-D-glucose の酵素基質複合体については高い分解能の結晶構造が得られていない。LgdA のユニークな基質認識機構をより深く理解するためには、より高い分解能の結晶構造をもとに D-glucose がどのようなかたちで LgdA と結合しているのかを明らかにすることが必要であろう。

HPLC、NMR 解析の結果、LgdA の L-glucose を基質とした反応産物は L-gluconate であることが明らかとなった。実際には環状構造をとった L-glucose のアノマー水酸基が脱水素反応により酸化された場合、生成するのは L-glucono- δ -lactone であることが予想される。しかし L-glucono- δ -lactone のようなアルドノラク톤は、一般的に水溶液中では非酵素的に加水分解をうけ、対応するアルドン酸となり、pH が中性以上ではカルボキシル基のプロトンが解離してラク톤には戻らない。LgdA の L-glucose を基質とした直接的な反応産物が L-glucono- δ -lactone であるのか、それとも L-gluconate であるのかははっきりしないが、いずれにしても 1 位の水酸基を酸化しない限り L-gluconate は生じ得ないため、LgdA は L-glucose の 1 位の水酸基を酸化し、結果として L-gluconate が生じると考えて間違いないであろう。

LgdA の実質的な基質である *scyllo*-inositol にはアルツハイマー病の原因となる β -アミロイ

ドの沈着を抑制することが分かっており (McLaurin *et al.* 2000)、実際に *Bacillus subtilis* を用いて天然に豊富に存在する *myo*-inositol から *scyllo*-inositol を生産する研究が進められている (Yamaoka *et al.* 2011)。LgdA の反応平衡は著しく reductase 活性、すなわち *scyllo*-inositol を生成する方向に偏っており、また *Bacillus subtilis* 由来の酵素 (IolW) よりも強い *scyllo*-inosose reductase 活性を有しているため、*Paracoccus* sp. 43P 株を用いた *scyllo*-inositol 生産の可能性について今後検討する価値があるだろう。一方で LgdA は L-glucose を基質とした反応産物と予想される L-glucono- δ -lactone、L-gluconate を基質としたレダクターゼ活性は有しておらず、ノンカロリー甘味料としての可能性が期待される L-glucose の生産に応用できるものではないと考えられる。

第四章 *lgn* 遺伝子群のクローニングと機能解析

第一節 緒言

前章の結果から、*Paracoccus* sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路では、L-glucose がまず LgdA による 1 位の水酸基の NAD⁺依存的な脱水素反応を受け、結果として L-gluconate となることが示された。L-gluconate もまた L-glucose と同様に自然界での存在が確認されておらず、生物による分解に関する報告も存在しない。そのため L-gluconate がさらにどのような化合物に変換され代謝されていくのかを明らかにすることは、新規な代謝経路の発見につながることを期待される。本章では 43P 株の L-glucose 代謝における第二段階を触媒する酵素、L-gluconate dehydrogenase の精製、遺伝子の同定を行い、同酵素遺伝子を含む遺伝子クラスターの解析を行った。

第二節 材料及び方法

4-2-1. 実験材料

使用培地

L-gluconate dehydrogenase の精製の際の培養には、前培養に LB 培地、本培養に L-glucose 最少培地 (Table 3-2-1) に 0.1% Yeast extract を添加したものを用いた。生育試験は L-glucose 最少培地の炭素源を、L-glucose から 10 mM potassium L-gluconate、または 10 mM sodium D-idonate に変更した培地を用いて行った。

使用プライマー

L-gluconate dehydrogenase 遺伝子のクローニングおよび周辺遺伝子の解析に用いたプライマーを Table 4-2-1 に示す。

4-2-2. 各種アルドン酸の合成

Potassium L-gluconate、potassium D-galactonate の合成は Moore らの方法に従って次に示すように行った。ヨウ素 5.7 g を 80 ml のメタノールに溶解し、40℃に加熱した。2 g の L-glucose または D-galactose を 3 ml の蒸留水に溶解した後 25 ml のメタノールに溶解し、40℃に加熱した。両溶液を混合し、4%水酸化カリウムをメタノールに溶解した溶液(KOH-MeOH 溶液)を 15 分間かけて 65 ml 滴下した。10 分間攪拌し、さらに 50 ml の KOH-MeOH 溶液を滴下した。さらに 10 分間攪拌し、室温まで冷却した。吸引ろ過により沈殿物を回収し、メタノールで 2 回洗ったあとジエチルエーテルで洗浄して減圧下乾燥した。得られた粉末を GC/MS に供して生成物を確認した。

Sodium D-idonate、sodium L-galactonate、sodium L-mannonate は対応する D-idono-1,4-lactone, L-galactono-1,4-lactone, L-manno-1,4-lactone (Carbosynth) を水に溶解させた後、2 M NaOH 水溶液を pH が 9.0 以上となるまで添加し、TLC でラクトンの加水分解を確認した後、2 N 塩酸を用いて pH を中性としたものを標品とした。

4-2-3. L-gluconate dehydrogenase 活性の測定

各種炭素源をそれぞれ単一炭素源として培養した 43P 株より、3-2-2 に従って調製した無細胞抽出液、または粗精製酵素を用いて、反応液 200 μ l (100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM NAD^+ , 1 mM potassium L-gluconate, 2.5% (v/v) 無細胞抽出液または粗精製酵素) 中で反応を行い、NADH の産生を 340 nm の紫外吸収をモニターすることで L-gluconate dehydrogenase 活性を測定した。反応温度は 25°C とした。

4-2-4. L-gluconate dehydrogenase の精製

1) 培養および無細胞抽出液の調製

200 ml の LB 培地 (500 ml 用ハネつきフラスコ 2 本) 中で 120 rpm、28°C で一晚培養した 43P 株を集菌し、200 ml の L-glucose 最少培地 (500 ml 用ハネつきフラスコ 2 本) に全量植菌して 120 rpm、28°C で 6 時間培養した。培養後の菌体を遠心分離により集菌後、氷冷した B バッファー (100 mM Tris-HCl, pH 8.5, 2 mM DTT, 20% glycerol (v/v)) 30 ml に懸濁し、氷上で SONIFER 250 (Branson) による超音波破碎を 30 分間行った。破碎液を 27,400 \times g、4°C、30 分間遠心した後、上清を 0.22 μ m のフィルターに通し、無細胞抽出液とした。

2) DEAE-Cellulose 弱陰イオン交換クロマトグラフィー

上記無細胞抽出液を B バッファーで平衡化した DEAE cellulose DE52 (Whatman) を充填したエコノカラム (内径 1 cm, 高さ 15 cm) に全量添加した。同カラムの流速は 0.8 ml min^{-1} とし、BioLogic LP システム (Bio-rad) により操作を行った。カラム体積の 3 倍量の B バッファーを通液して非吸着タンパク質を溶出後、NaCl 濃度 50-500 mM のグラジエントにより吸着したタンパク質を溶出した。NaCl 濃度 170-200 mM で溶出した L-gluconate dehydrogenase 活性をもつ画分をまとめ、B バッファーで一晩透析、脱塩した。サンプルを再度 B バッファーで平衡化した DEAE-cellulose カラムに添加し、120 mM NaCl を含む B バッファーで洗浄後、NaCl 濃度 120-250 mM のグラジエントにより吸着したタンパク質を溶出させた。得られた L-gluconate dehydrogenase 活性を持つ画分をまとめた。

3) Mono Q 強陰イオン交換クロマトグラフィー

以降のクロマトグラフィーは AKTA FPLC システムを用いて行った。活性画分を等量の B バッファーで希釈し、B バッファーで平衡化した Mono Q 5/50 GL に全量添加して 10 ml の 200 mM NaCl を含む B バッファーで非吸着タンパク質を溶出後、200-350 mM の NaCl グラ

ジェントにより吸着タンパク質を溶出した。流速は 1 ml min^{-1} とした。L-glucose dehydrogenase 活性は NaCl 濃度 280 mM で溶出した。活性画分を Amicon Ultra-0.5 mL 10 K (Milipore) を用いて濃縮した。

4) Superdex 200 10/300 GL ゲルろ過クロマトグラフィー

活性画分を 150 mM NaCl を添加した B バッファーで平衡化した Superdex 200 10/300 GL に加え、流速 0.5 ml min^{-1} で分画した。活性画分を集め、保存用バッファー(100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM DTT, 50% glycerol)で透析し、 -20°C で保存した。

4-2-5. タンパク質濃度の定量

3-2-4 に従って行った

4-2-6. SDS-PAGE

3-2-5 に従って行った

4-2-7. 精製酵素の N 末端アミノ酸配列の解析

3-2-9 に従って PVDF 膜に転写後、北海道システムサイエンス社に解析を委託した。

4-2-8. L-gluconate dehydrogenase をコードする遺伝子、*lgnH* のクローニング

1) 縮重プライマーを用いた L-gluconate dehydrogenase 遺伝子部分の PCR 増幅と塩基配列の同定

43P 株における L-gluconate dehydrogenase のオルソログと推定された *P. denitrificans* PD1222 株由来の推定 alcohol dehydrogenase、Pden_4931 のアミノ酸配列をもとにアライメントを作製した。アライメントで見出された内部アミノ酸配列保存領域、および N 末端アミノ酸配列からそれぞれ作製した縮重プライマー、LGnDH_NterFII、LGnDH_midRIII を用いて、2-2-6 に従って調製した 43P 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った。PCR には ExTaq を使用し、アニーリング温度は 50°C 、伸長時間は 1 分とした。増幅した約 500 bp の DNA 断片を抽出、精製し、pGEM-T Easy vector system (Promega) を用いて同断片をクローン化し、pGEM-lgnH500 を得た。同プラスミドを鋳型として M13F、M13R プライマーを用いたシーケンスを行った。

2) インバース PCR による *lgnH* の全長およびその周辺遺伝子の解析

43P 株のゲノム DNA 10 μg を 50 μl のスケールで *Pst*I で一晩処理し、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿後、30 μl の TE バッファーに溶解した。同溶液 1 μl を 100 μl の

系で T₄ DNA ligase (Promega)を用いて一晩処理し、セルフライゲーションを行った。ライゲーション後の溶液 1 µl を鋳型とし、プライマーセット、LGNDH_invF、LGNDH_invR を用いたインバース PCR 反応を行った。PCR 酵素は ExTaq を用い、アニーリング温度は 55°C、伸長時間は 4 分間とした。得られた約 2,500 bp の DNA 断片を pGEM-T Easy vector system によりクローニングした。上記のインバース PCR、シークエンス PCR、プライマーウォーキングを繰り返し、*lgnH* およびその周辺遺伝子の塩基配列、約 10 kb を解析した。

4-2-9. Lgn 酵素群の大腸菌を宿主とした発現、精製

lgnE、*lgnF*、*lgnG*、*lgnH*、*lgnI* の ORF を Table 4-2-2 に示したプライマーで 43P 株のゲノム DNA を鋳型としてそれぞれ PCR 増幅し、プライマーに付加した認識配列に対応する制限酵素で処理した後、対応する制限酵素で処理した pET28a (+)と混和し、T₄ DNA ligase でライゲーション反応を一晩行った。ついでライゲーション溶液を *E. coli* DH10B にエレクトロポレーション法を用いて導入することで、pETlgnE、pETlgnF、pETlgnG、pETlgnH、pETlgnI を得た。得られたプラスミドをそれぞれ *E. coli* BL21 (DE3)にエレクトロポレーションにより導入し、各遺伝子発現株とした。各株の培養は 50 µg ml⁻¹ のカナマイシン硫酸塩を含む 100 ml の LB 培地を用いて 37°C、120 rpm で行い、O.D.= 0.5 となった時点で IPTG を終濃度 0.2 mM となるよう添加した後、28°C、120 rpm で 3 時間培養した。この際 pETlgnE 保有株については IPTG 添加後の培養時間を 12 時間とした。各リコンビナント酵素の精製、保存に関しては 3-2-15 に従って行った。

4-2-10. His₆-DgoD の調製

E. coli DH10B 株のゲノム DNA を鋳型として、DgoD10B_NdeF、DgoD10B_XhoR のプライマーセットを用いた PCR を行った。増幅産物をゲル抽出後 *Nde*I、*Xho*I で処理し、同様の処理を行った pET28a (+)と混和して T₄ DNA ligase によるライゲーション反応を一晩行った。ライゲーション溶液を *E. coli* DH10B にエレクトロポレーションにより導入し、pETdgoD を得た。さらに同プラスミドを *E. coli* BL21 (DE3)にエレクトロポレーションにより導入し、3-2-15 の方法にしたがって His₆-DgoD を精製した (Babbitt *et al.* 1995)。

4-2-11. 2-keto-3-deoxy-D-galactonate (KDGal)の調製

4-2-2 にしたがって調製した potassium D-galactonate 200 mg を 10 ml の反応バッファー(30 mM Tris-HCl, pH7.5, 5 mM MgCl₂) に溶解し、300 µg の His₆-DgoD を加えて 37°C で 5 時間インキュベートした。3-2-18 に従って TLC により D-galactonate の消失、KDGal の生成を確認後、3 g の DOWEX 1x8 (200-400 mesh, acetate form)を充填し、脱イオン水で平衡化したカラムに反応液を添加し、40 mM 酢酸水溶液 20 ml を通液して非吸着物質を洗浄した。ついで 200 mM potassium acetate 水溶液を 10 ml 通液し、溶出液を 1 ml ずつ分画した。3-2-18 に従って各画分について TLC による解析を行い、KDGal を含む画分をまとめて凍結乾燥した。

凍結乾燥物を少量の水に溶解した後、氷冷したエタノールをサンプル溶液の 5 倍量添加し、析出した KDGal のカリウム塩を含む固形物を遠心分離した。エタノールで 2 回洗浄して酢酸カリウムを除き (Groeve *et al.* 2009)、最後にジエチルエーテルで洗浄して減圧乾燥させることで KDGal の potassium 塩を得た。

4-2-12. 2-keto-3-deoxy-6-phospho-D-galactonate (KDPGal)の合成

反応液 20 ml (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM MgCl₂, 40 mM KDGal, 80 mM ATP disodium, 0.2 mg His₆-LgnF)を 30°Cで 4 時間インキュベートした。反応後、2 g の活性炭を添加し、37°Cで 15 分間反応させて ATP および ADP を吸着させた。反応液を 0.45 µm フィルターに通すことで活性炭を除去し、再度 2 g の活性炭を加え上記の操作を繰り返した。反応液を 5 g の DOWEX 1x8 (200-400 meq, Cl⁻ form, Wako)を充填したカラムに添加して KDPGal を吸着させ、80 mM の HCl 20 ml を通液して未反応の KDGal を溶出後、20 ml の 200 mM HCl を通液して KDPGal を溶出させた。この際 1 ml ずつ溶出液を分画した。3-2-18 に従って TLC 解析により KDPGal を含む画分を確認後まとめ、炭酸カルシウムのスラリーを pH が中性となるまで添加した。余剰量の炭酸カルシウムを遠心分離、フィルター通液により除去し、凍結乾燥により乾固させた。同固形物を 1 ml の脱イオン水に溶解し、9 ml のエタノールを加えて KDPGal のカルシウム塩を析出させた。析出したカルシウム塩を遠心分離した後 1 ml のエタノールで 3 回洗浄することで無機塩を除去し、再度凍結乾燥して KDPGal カルシウム塩とした。

4-2-13. 過ヨウ素酸チオバルビツール酸法による KDPGal の定量

KDPGal のカルシウム塩を水に溶解後、希釈系列を作製した。各溶液 50 µl に対して 125 µl の過ヨウ素酸試薬(125 mM H₂SO₄, 25 mM periodic acid)を加えて室温で 20 分間反応後、250 µl の亜ヒ酸試薬(2% sodium arsenite, 0.5 M HCl)を加えて酸化反応を停止させた。さらに 1 ml の 0.3 %チオバルビツール酸水溶液を加え、10 分間煮沸した。反応後の液を等量の DMSO で希釈し、A549 nm を測定してモル吸光係数($6.78 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)より反応産物を定量した (Kim *et al.* 2005)。

4-2-14. キネティックパラメーターの測定

1) LgnH (L-glucate dehydrogenase)

200 µl の反応液(100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM NAD⁺, 0.5 µg His₆-LgnH, 0.2-16 mM L-gluconate または 0.1-4 mM L-galactonate)中で、NAD⁺の還元に伴う 340 nm の吸光度の上昇を DU800 spectrophotometer により測定した。NAD⁺に対するキネティックパラメーターを測定する場合は上記の条件で potassium L-gluconate の濃度を 10 mM に固定し、NAD⁺の濃度を 0.025-4 mM としてそれぞれ活性を測定した。

2) LgnI (5-keto-L-gluconate reductase)

200 μ l の反応液(100 mM HEPES-KOH, pH 7.0, 0.2 mM NADPH, 0.1 μ g His₆-LgnI, 0.075-3 mM 5-keto-L-gluconate)中で、NADPH の酸化に伴う 340 nm の吸光度の減少を DU800 soectrophotometer により測定した。NADPH に対するキネティックパラメーターを測定する場合は上記の条件で sodium 5-keto-L-gluconate の濃度を 2 mM に固定し、NADPH の濃度を 0.0125-0.4 mM としてそれぞれ活性を測定した。

3) LgnE (D-idonate dehydratase)

100 μ l の反応液(100 mM Tris-HCl, pH, 7.5, 0.5 mM FeCl₂, 20 mM DTT, 5 μ g His₆-LgnE, 0.5-8 mM sodium D-idonate)中で反応を行った。Sodium D-idonate の添加で反応を開始し、30℃、15 分間インキュベートした後 DNS 試薬 200 μ l を添加して反応を停止し、沸騰浴中で 5 分間反応させて発色させた。反応液を 900 μ l の脱イオン水で希釈し、535 nm の吸光度を測定し、4-2-11 に従って調製した KDGal 標品より求めた DNS 法における KDGal のモル吸光係数 $\epsilon = 91 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ より各 D-idonate 濃度における活性を測定した。

4) LgnF (KDGal kinase)

LgnF の活性測定は、pyruvate kinase (PK)及び lactate dehydrogenase (LDH)とのカップリング反応により行った。200 μ l の反応液(100 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 1 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADH, 1 mM phosphoenolpyruvate, 1.5 U LDH (Sigma-Aldrich), 2 U PK (Sigma-Aldrich), 1 μ g His₆-LgnF, 0.2-32 mM KDGal) 中で室温で反応を行い、ATP 依存的なキナーゼ活性による ADP の生成を PK と LDH とのカップリング反応により測定した。すなわち生成した ADP 量に依存して PK が phosphoenolpyruvate を pyruvate に変換し、ついで生じた pyruvate を LDH により L-lactate に変換し、その過程で NADH が NAD⁺に酸化される。この NADH の減少速度を DU800 spectrometer で測定し、ADP の生成速度として活性を測定した。

5) LgnG (KDPGal aldolase)

LgnG の活性は反応生成物である pyruvate、D-glyceraldehyde-3-phosphate (Gap)それぞれに対して特異的な酵素とのカップリング反応により測定した。Pyruvate の生成を測定する場合、200 μ l の反応液(100 mM potassium phosphate, pH 7.0, 0.2 mM NADH, 1.5 U LDH (Sigma-Aldrich), 1 μ g His₆-LgnG, 0.1-6.4 mM KDPGal)中で室温で反応を行い、生成物である pyruvate が LDH により L-lactate に変換される際に減少する NADH 量を DU800 spectrophotometer で測定した。Gap の生成を測定する場合、反応条件はほぼ上記と同じで、0.2 mM NADH、1.5 U LDH の代わりにそれぞれ 2 mM NAD⁺、2 U D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich)を加え、室温で反応させて、生成物である Gap が D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase により 1,3-bisphosphoglycerate に変換される際に生じる NADH を DU800 spectrophotometer で定量した。

4-2-15. Lgn 酵素群の反応産物の精製

1) LgnH 反応産物の精製

100 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM potassium L-gluconate, 2 mM NAD^+ , 40 mM *scyllo*-inosose (Hokko chemical industry), 0.2 mg His₆-43PIolG, 0.2 mg His₆-LgnH よりなる反応液 10 ml を 30°C で 8 時間インキュベートした。反応液に 200 mg の活性炭を加えて 37°C で 15 分間混和することで NAD^+ , NADH を除去し、0.45 μm のフィルターを通過させることで活性炭を除いた。ついで反応液を 3 g の DOWEX 1x8 (200-400 mesh, Cl⁻ form) を充填したカラムに添加し、20 ml の脱イオン水で洗浄後、200 mM HCl を 10 ml 通液して LgnH の反応産物を溶出させた。この際溶出液を 1 ml ずつ分画し、3-2-18 に記載した TLC 解析により LgnH 反応産物を含む画分を確認後まとめた。ついでこの溶液に炭酸カルシウムを pH が中性となるまで添加し、余剰量の炭酸カルシウムを遠心分離、フィルター処理により除き、凍結乾燥により反応液の容量を 200-500 μl まで濃縮した。得られた濃縮液に 1 ml のエタノールを添加し、LgnH の反応産物をカルシウム塩として析出させ、1 ml の 70%エタノールで 3 回、ジエチルエーテルで 1 回洗浄後再度凍結乾燥を行い LgnH の反応産物のカルシウム塩を得た。LgnH の反応産物の純度は DNS 法 (2-2-3)により検討した。

2) LgnI 反応産物の精製

100 mM potassium acetate, pH 5.0, 20 mM LgnH 反応産物, 30 mM NADPH, 0.2 mg His₆-LgnI からなる反応液 20 ml を 30°C で 2 時間反応させた。反応の進行に伴い pH が上昇するので、10% acetic acid を経時的に添加して pH を 6.0 以下になるように調整した。反応後の液体に 2 g の活性炭を加えて 37°C で 10 分間混和した後、0.45 μm のフィルターにより活性炭を除去した。処理液を用いて 3-2-18 に記載した TLC 解析を行い、 NADP^+ 、NADPH に相当するスポットが消失するまで同様の操作を繰り返した後、反応液を 3 g の DOWEX 50W (200-400 mesh, H⁺ form) を充填したカラムに通液し、カチオンを除去した。ついで反応液を減圧下、40°C で濃縮して酢酸をできるだけ揮発させ、乾燥物を 1 ml の脱イオン水に溶解後、2 M 水酸化ナトリウム溶液を pH が 8-10 となるまで添加した。pH 調整後、液体を 2 g の DOWEX1x8 (200-400 mesh, formate form) を充填したカラムに通液し、LgnI 反応産物を吸着させた。ついで 20 ml の脱イオン水を通液して洗浄後、10 ml の 100 mM formate を通液して LgnI 反応産物を溶出させた。LgnI 反応産物を含む画分をまとめて凍結乾燥を 2 回行い、LgnI 反応産物のシロップを得た。

3) LgnE 反応産物の精製

100 mM Tris-acetate, pH 7.5, 50 mM sodium D-idonate, 20 mM DTT, 0.5 mM FeCl_2 , 0.5 mg His₆-LgnE からなる反応液 10 ml を 30°C で 5 時間インキュベートした。反応後の液体には析出した鉄含有無機化合物が見られるので、これを 0.45 μm のフィルターを用いて除去し、ついで 2 g の AG501-X8 (20-40 mesh, Bio-Rad) を充填したカラムを通過させて負に帯電した無

機鉄化合物を除いた。同カラムに 10 ml の脱イオン水を通液して上述の通過液とまとめ、2 g の DOWEX 1X8 (200-400 mesh, acetate form) を充填したカラムに通液して LgnE 反応産物を吸着させた。反応液を 80 mM の酢酸 20 ml で洗浄した後、200 mM potassium acetate を通液して LgnE 反応産物を溶出させ、以降は 4-2-11 に従って LgnE 反応産物の potassium 塩を調製した。

4-2-16. 反応産物の NMR による同定

1) LgnH 反応産物の構造決定

LgnH 反応産物のカルシウム塩 30 mg を 1 ml の水に懸濁し、同液に 100 mg の DOWEX 50W (200-400 mesh, H⁺ form) を添加して混合することで溶解させた。DOWEX 50W を遠心分離、フィルター処理により除去し、凍結乾燥により乾固した。凍結乾燥物を 0.5 ml の D₂O に溶解し、重水酸化ナトリウム溶液 (Merck) により pH を 8.0-10.0 としてこれを測定試料とした。核磁気共鳴スペクトル解析は 3-2-12 に準じて行い、HH-COSY (correlation spectroscopy)、HMQC (heteronuclear multiple quantum coherence) による解析も合わせて行い各化学シフトを帰属した。標品としては potassium 5-keto-D-gluconate (Sigma-Aldrich) を用いた。

2) LgnI 反応産物の構造決定

LgnI 反応産物のシロップ 20 mg を 0.5 ml の D₂O に溶解し、重水酸化ナトリウム溶液 (Merck) により pH を 8-10 としてこれを測定試料とした。以降は LgnH 反応産物の構造決定と同様に行った。標品には D-idonic acid 1,4-lactone (Carbosynth) を上記と同様に処理したものをを用いた。

3) LgnE 反応産物の構造決定

LgnE 反応産物の potassium 塩 20 mg を 0.6 ml の D₂O に溶解し、測定試料として 3-2-12 に準じて核磁気共鳴スペクトル解析を行った。標品には KDGal の potassium 塩を用い、化学シフトの帰属は 2-keto-3-deoxy-L-galactonate のスペクトルと比較して行った (Kuorelahti *et al.* 2006)。

4-2-17. HPLC 解析

3-2-20 に準じて行った。

Table 4-2-1. Primers used in this chapter.

| Primer | Sequence (5'-3') |
|--|---|
| Degenerate primers used for cloning of L-gluconate dehydrogenase | |
| LGNdH_NterFII | ATHGARAARGARGGNCAYAC |
| LGNdH_midRIII | CCCATNCCDATCATNCCRCA |
| Primers used for primer walking | |
| LGNDH_invF | AATGGAAAAGGTCATTCTGAA |
| LGNDH_invFII | GATGTCGTGTTTCGAAGCTGT |
| LGNDH_invFIII | CAATGCGACTATGACGGACT |
| LGNDH_invR | AGGGTGACCAAAGGATTAAAC |
| LGNDH_invRII | ACATCACATCTTCGTCGATG |
| LGNDH_invRIII | ACAGGCTGTTGTTGCGATGC |
| LGNDH_invRIV | CAGTCGATATAACCGGCCTC |
| 43P4929_invF | TGTAGTCGTTTGCGGCATGG |
| 43P4929_invFII | TCGAGAGATTTTCGAAACGC |
| 43P4929_invFIII | GTGCATGTCCAGAACGTTAT |
| 43P4929_invR | AGAGCCAGATCCTGAAGCTG |
| 43P4929_invRII | CAACTCGCTTTTTGAGGCTT |
| 43P4929_midF | CAATGGCTTCGGCAATATCC |
| 43P4928_invF | CAAGCCTCAAAAAGCGAGTT |
| 43P4928_invR | GCTTTCATCGCGATATTTCC |
| 43P4926_midR | GACTTCGTCAAACAGCATGAGT |
| 43P4926_midFII | GTGATTGCACACCGTGATCT |
| 43P4926_NterR | ATTTCCCCGAAGTAAGCGCTT |
| 43P4924_NterR | GAGATCTGCGACACAAGGCT |
| 43P4923_CterF | CGGAACATCATGATCCTGGCA |
| 43P4923_NterR | GCCAACAAATTCCCCAATCGC |
| Primers used for construction of expression plasmids | |
| LgnH_NdeF | GAGAGAC ATATG AAGGCGCTTATCATCGAGA |
| LgnH_XhoR | GGCCCC TCGAGT CATAGTGCCACCATCACTT |
| LgnI_NdeF | GGGAGGC ATATG AGCGACAGTTTCAAAAAA |
| LgnI_XhoR | GAGAC TCGAGT TAGAACCCTGCGAGTGCCC |
| LgnF_NheF | GAGAGAG CTAGC ACGAATGGAATAGCGCCACG |
| LgnF_XhoR | TAAC TCGAGT CAGGGCCAGATACGGGTGG |

| | |
|--------------|---|
| LgnG_NdeF | GAGAGAC ATATG AATTTTCCAACCTCTCCCCC |
| LgnG_EcoR | TTT GAATTCT CATGCGAGGCCTCCTGATGTCT |
| LgnE_NdeF | GAGAGAC ATATG AAAAGCTAAAACAATCCGGC |
| LgnE_EcoR | GAAG AATTCT CACGTCACCACCGCAAGCTGCCAA |
| DgoD10B_NdeF | GAGAGAC ATATG AAAATCACCAAAATTACCAC |
| DgoD10B_XhoR | GGG CTCGAGT TACCACTCTGCTACGCTGTTAT |

第三節 L-グルコン酸デヒドロゲナーゼの精製

4-3-1. L-gluconate dehydrogenase (L-GnDH)活性の測定

L-glucose を単一炭素源として生育した *Paracoccus* sp. 43P 株の無細胞抽出液中に、L-glucose より化学合成した potassium L-gluconate を基質として NAD^+ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性が検出された。この際 NADP^+ を補酵素とした活性は検出されなかった。同様の活性は potassium L-gluconate を単一炭素源として培養した場合の無細胞抽出液中にも検出された一方で、D-glucose、*myo*-inositol、L-galactonate を炭素源とした場合には検出限界に近いレベルであった (Table 4-3-1)。

4-3-2. L-GnDH の精製

L-glucose を炭素源として培養した 43P 株より L-GnDH 活性を有する酵素を 96 倍まで精製した (Table 4-3-2)。SDS-PAGE 上では単一バンドとなるまで精製することは出来なかった (Fig. 4-3-1) が、Superdex 200 によるゲルろ過クロマトグラフィーの各画分中の L-GnDH 活性は 37 kDa のバンドの強度に比例していた (データ示さず)。このことからこのタンパク質が L-GnDH 活性を有する酵素であると考え、N 末端アミノ酸配列の解析を行った。

Table 4-3-1. L-GnDH activity in the cell-free extract from *Paracoccus* sp. 43P cultivated with various carbon sources.

| Cultivated carbon source | Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
|--------------------------|---|
| L-glucose | 0.139 |
| L-gluconate | 0.180 |
| D-glucose | 0.003 |
| <i>myo</i> -inositol | 0.006 |

Table 4-3-2. Purification of L-GnDH

| Purification step | Total protein (mg) | Total activity ($\mu\text{mol min}^{-1}$) | Specific activity ($\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$) | Yield (%) |
|--------------------------------|-----------------------|--|---|--------------|
| Cell-free extract | 149 | 33.9 | 0.23 | 100 |
| 1 st DEAE-cellulose | 45.7 | 27.1 | 0.59 | 80.0 |
| 2 nd DEAE-cellulose | 16.4 | 17.7 | 1.07 | 52.1 |
| Mono Q 5/50 | 0.36 | 4.61 | 12.7 | 13.6 |
| Superdex 200 10/300 | 0.04 | 0.851 | 22.0 | 2.51 |

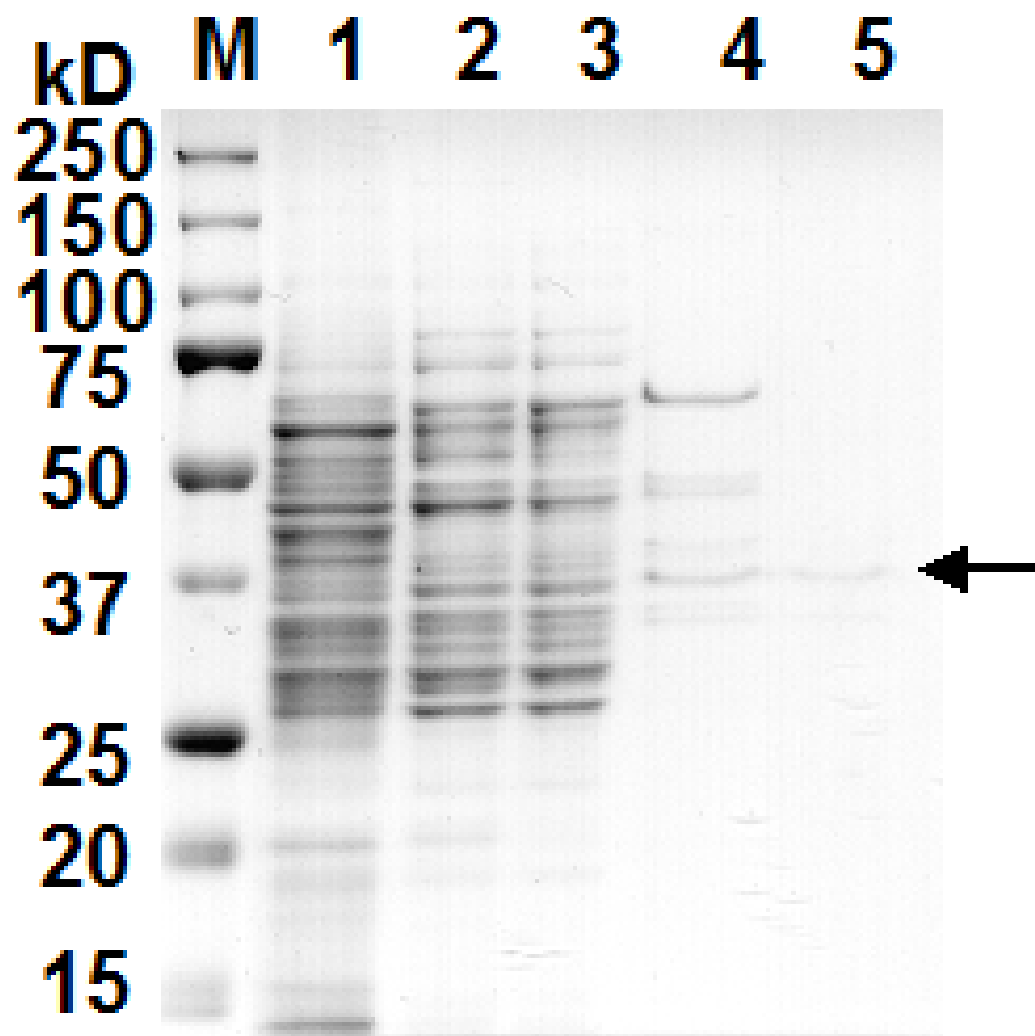


Figure 4-3-1. SDS-PAGE of L-GnDH purification steps.

Lanes M, molecular marker; 1, cell-free extracts; 2, after 1st DEAE-cellulose; 3, after 2nd DEAE-cellulose; 4, after Mono Q 5/50 GL; and 5, after Superdex 200 10/300 GL chromatography. The arrow indicates the position of L-GnDH.

第四節 *lgn* 遺伝子群のクローニング

4-4-1. L-GnDH の N 末端アミノ酸配列の同定

上記の精製過程で得たサンプルを SDS-PAGE により分離し、PVDF 膜に転写後、分子量 37 kDa に相当するバンドを切り取り、エドマン分解法により N 末端アミノ酸配列を決定した。その結果、本酵素の N 末端 20 残基のアミノ酸配列は、MKALHIEKEGHTVIGEISEP であった。

4-4-2. データベース解析とアライメントによる内部アミノ酸保存領域の推定

L-GnDH の N 末端アミノ酸配列を BLAST 検索に供したところ、ゲノム配列が明らかとなっている *Paracoccus denitrificans* PD1222 株の推定オキシドレダクターゼ、Pden_4931 の N 末端部分と完全に一致した。そこで Pden_4931 のアミノ酸配列全長をデータベース検索に供し、相同性が見られるタンパク質とアライメントを作製したところ、Pden_4931 のアミノ酸配列中の 169-175 番目のアミノ酸残基 (CGMIGMG) が、相同性を示すタンパク質においても保存されていることを見出した (データ示さず)。

4-4-3. 縮重プライマーによる L-GnDH 遺伝子 (*lgnH*) の ORF 5'側領域の取得

N 末端アミノ酸配列及びアライメントより得られたアミノ酸配列保存残基から縮重プライマーセットを設計し、43P 株のゲノム DNA を鋳型とした PCR を行った結果、約 500 bp の DNA 断片の増幅が認められた。増幅した断片を pGEM-T Easy ベクターにクローニングした後、配列を解析した結果、得られた塩基配列は Pden_4931 の ORF 中の 5'側約 500 bp と高い相同性を示した。

4-4-4. インバース PCR による *lgnH* の全長および *lgn* 遺伝子群のクローニング

得られた *lgnH* の ORF 中の 5'側約 500 bp の塩基配列をもとに外向きのプライマーセットを作製し、*Pst*I で制限酵素処理後セルフライゲーションを行った 43P 株のゲノム DNA を鋳型としたインバース PCR を行った。その 2,500 bp の DNA 断片の増幅が観察されたので、同 DNA 断片の配列を解析した結果、1,011 bp からなる *lgnH* の ORF 全長を取得した。同遺伝子のアミノ酸配列は *P. denitrificans* PD1222 株の Pden_4931 と 84%の相同性を示した。さらにインバース PCR とプライマーウォーキングを繰り返し、*lgnH* の周辺遺伝子の解析を進めた結果、同遺伝子の周辺には 9 つの ORF が存在し、遺伝子クラスターを形成していることが明らかとなった(Fig. 4-4-1)。以降は同遺伝子クラスターを *lgn* 遺伝子群とする。また、43P 株の *lgn* 遺伝子群のオルソログと推定される遺伝子が、*P. denitrificans* PD1222 株のゲノム配列中にも見受けられた。*P. denitrificans* PD1222 株における各遺伝子のアノテーションを Table 4-4-1 に示す。

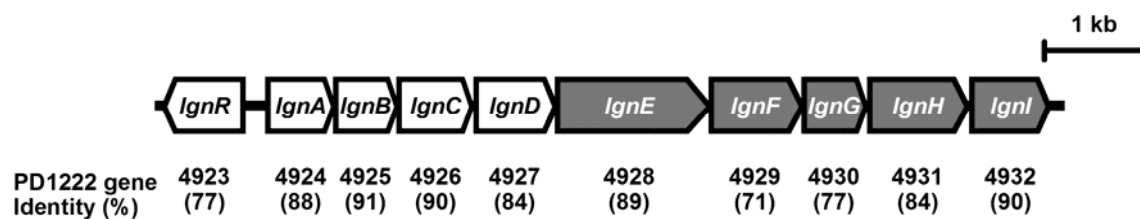


Fig. 4-4-1. Gene organization of the cluster containing *lgnH*. Genes encoding the enzymes for L-glucose catabolism are shaded, and sequence identities to corresponding *P. denitrificans* PD1222 genes are shown below.

Table 4-4-1. Annotated functions of genes located on the *lgn* gene cluster.

| <i>Orf</i> | Annotated function |
|-------------|---|
| <i>lgnR</i> | IclR family transcriptional regulator |
| <i>lgnA</i> | ABC transporter inner membrane subunit |
| <i>lgnB</i> | ABC transporter inner membrane subunit |
| <i>lgnC</i> | ABC transporter related |
| <i>lgnD</i> | Extracellular solute binding protein |
| <i>lgnE</i> | galactarate dehydratase |
| <i>lgnF</i> | 2-keto-3-deoxy-D-galactonate kinase |
| <i>lgnG</i> | 2-keto-3-deoxy-6-phospho-D-galactonate aldolase |
| <i>lgnH</i> | L-gluconate dehydrogenase |
| <i>lgnI</i> | short chain dehydrogenase |

第五節 Lgn タンパク質の機能解析

4-5-1. 大腸菌を宿主とした Lgn タンパク質の発現、精製

lgn 遺伝子群中で酵素をコードすることが推定される *lgnE*、*lgnF*、*lgnG*、*lgnH*、*lgnI* をそれぞれ pET system を用いて N 末端に His-tag を付加して発現させることを試みた。その結果すべての遺伝子は *E. coli* BL21 (DE3) を宿主として良好に発現し、それらの発現産物は HisTrap カラムのみで SDS-PAGE 上で単一バンドとなるまで精製することができた (Fig. 4-5-1)。以降は N 末端に His タグを付加したリコンビナント Lgn タンパク質を His₆-LgnE, -LgnF, -LgnG, -LgnH, -LgnI とする。

4-5-2. Lgn タンパク質の酵素学的解析および反応生成物の解析

1) LgnH

L-GnDH として機能することが予想された His₆-LgnH は、L-gluconate を基質として NAD⁺ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性を有していた。このことからクローニングした遺伝子は予想通り L-GnDH であることが示された。一方で NADP⁺ を補酵素とした活性は有していなかった。デヒドロゲナーゼ活性の基質特異性について検討した結果、His₆-LgnH は L-gluconate、L-galactonate を基質とした活性を有していた (Table 4-5-1)。一方で L-mannonate、D-gluconate、D-galacturonate、D-glucuronate を基質とした活性は検出されなかった。

His₆-LgnH の L-gluconate を基質とした反応産物を精製し、NMR 解析を行った結果、反応産物は標品として用いた potassium 5-keto-D-gluconate と同様の ¹H、¹³C NMR スペクトルを有していた (Table 4-5-2)。一方で HPLC 解析では、potassium 5-keto-D-gluconate と同じ位置で溶出されたが、potassium 5-keto-D-gluconate が左旋光性を示すのに対して、His₆-LgnH 反応産物は右旋光性を示した (Fig. 4-5-2)。以上の結果から、LgnH は L-gluconate の 5 位の水酸基をケトンに酸化し、5-keto-D-gluconate の鏡像異性体である 5-keto-L-gluconate を生じさせることが示された。

2) LgnI

Short chain dehydrogenase として機能することが推察された His₆-LgnI を、NAD(P)⁺ の存在下で様々なアルドン酸とインキュベートし、NAD(P)⁺ の還元が起こるか検討した結果、D-idonate を基質として NADP⁺ を補酵素としたデヒドロゲナーゼ活性が検出された。一方で NAD⁺ を補酵素とした活性は検出されなかった。また NADP⁺ を補酵素としても、L-gluconate、L-galactonate、D-gluconate、D-galactonate を基質とした活性は検出されなかった。次に NADPH を補酵素としたレダクターゼ活性について検討した結果、LgnH の反応産物である 5-keto-L-gluconate を基質とした活性が検出された。一方で、5-keto-D-gluconate を基質とした活性は検出されなかった。デヒドロゲナーゼ、レダクターゼの両活性についてそれぞれキネティックパラメーターを測定した結果、反応平衡はレダクターゼ側に著しく偏ってい

た (Table 4-5-3)。

ついで His₆-LgnI の 5-keto-L-gluconate を基質とした反応産物を精製し、NMR 解析を行った結果、反応産物は標品として用いた D-idonate と同様の ¹H、¹³C NMR スペクトルを有していた。また同反応産物は HPLC 解析で D-idonate と同じ位置で溶出され、さらに同様の右旋光性を示した (Fig. 4-5-3)。以上の結果から LgnI は 5-keto-L-gluconate の 5 位のケトンの還元を触媒し、生成物として D-idonate を生じることが示された。

3) LgnE

lgnE のオルソログである Pden_4928 は galactarate dehydratase とアノテートされていたが、His₆-LgnE は meso-galactarate を基質とした活性を有していなかった(データ示さず)。一方で *lgnE* のアミノ酸配列は *E. coli* の D-altronate dehydratase とも相同性を示したことから、アルドン酸を基質とした脱水活性を有していることも考えられた。そこで L-gluconate、L-galactonate、L-mannonate、D-gluconate、D-galactonate、D-idonate を基質とした活性について検討した結果、D-idonate、L-gluconate、L-galactonate を基質とした活性を有していた。D-idonate を基質とした活性が最も強く、L-gluconate、L-galactonate を基質とした活性は D-idonate を基質とした場合を 100%としてそれぞれ 20%、11%であった。His₆-LgnE の D-idonate に対するキネティックパラメーターを測定した結果、 k_{cat} が $376 \pm 12 \text{ min}^{-1}$ 、 K_m が $0.454 \pm 0.072 \text{ mM}$ であった。

ついで His₆-LgnE の D-idonate を基質とした反応産物を精製し、NMR 解析を行った結果、*E. coli* DH10B 由来の DgoD を用いて合成した KDGal と同様の ¹H、¹³C スペクトルを有していた (Table 4-5-4)。さらに同反応産物は HPLC 解析で KDGal と同じ位置で溶出され、さらに同様の右旋光性を示した (Fig. 4-5-4)。以上の結果から、LgnE は D-idonate の 2 位、3 位からの脱水反応を触媒し、生成物として KDGal を生じることが示された。

4) LgnF

LgnF のアミノ酸配列は *E. coli* 由来の KDGal のリン酸化を触媒する酵素、DgoK と 33%の相同性を示した。そこで His₆-LgnF を ATP、MgCl₂ の存在下で KDGal とインキュベートしたところ、ADP の生成が観察された。Pyruvate kinase、lactate dehydrogenase を用いたカップリング法により同酵素の KDGal に対するキネティックパラメーターを測定した結果、 k_{cat} は $1710 \pm 34 \text{ min}^{-1}$ 、 K_m が $0.629 \pm 0.054 \text{ mM}$ であった。このことから、LgnF は KDGal を基質とした ATP 依存的なリン酸化活性を有していることが示された。

5) LgnG

LgnG のアミノ酸配列は *E. coli* 由来の KDGal のアルドール開裂反応を触媒する酵素、DgoA と 43%のアミノ酸配列相同性を示した。そこで LgnF 反応産物と His₆-LgnG をインキュベートした結果、pyruvate、D-glyceraldehyde-3-phosphate の生成が LDH、GapDH を利用し

た特異的な検出法によりそれぞれ確認された (Table 4-5-5)。この結果から、LgnF は KDGal の 6 位を ATP 依存的にリン酸化し、生じた KDPGal が続く LgnG の触媒するアルドール開裂反応により pyruvate と D-glyceraldehyde-3-phosphate に変換されることが示された。

上記のリコンビナント酵素を用いた解析の結果、43P 株において L-glucose はまず LgdA により 1 位の水酸基の酸化を受けて L-gluconate となった後、LgnH、LgnI の触媒する酸化還元反応により 5-keto-L-gluconate を経て D-idonate に変換され、ついで LgnE により 2 位、3 位からの脱水反応をうけて KDGal となり、LgnF の触媒する ATP 依存的なリン酸化によって KDPGal に変換された後、LgnG によって pyruvate と D-glyceraldehyde-3-phosphate に変換されることが予想された。今回の解析で明らかになった 43P 株の L-glucose 代謝経路のモデルを Fig. 4-5-5 に示す。

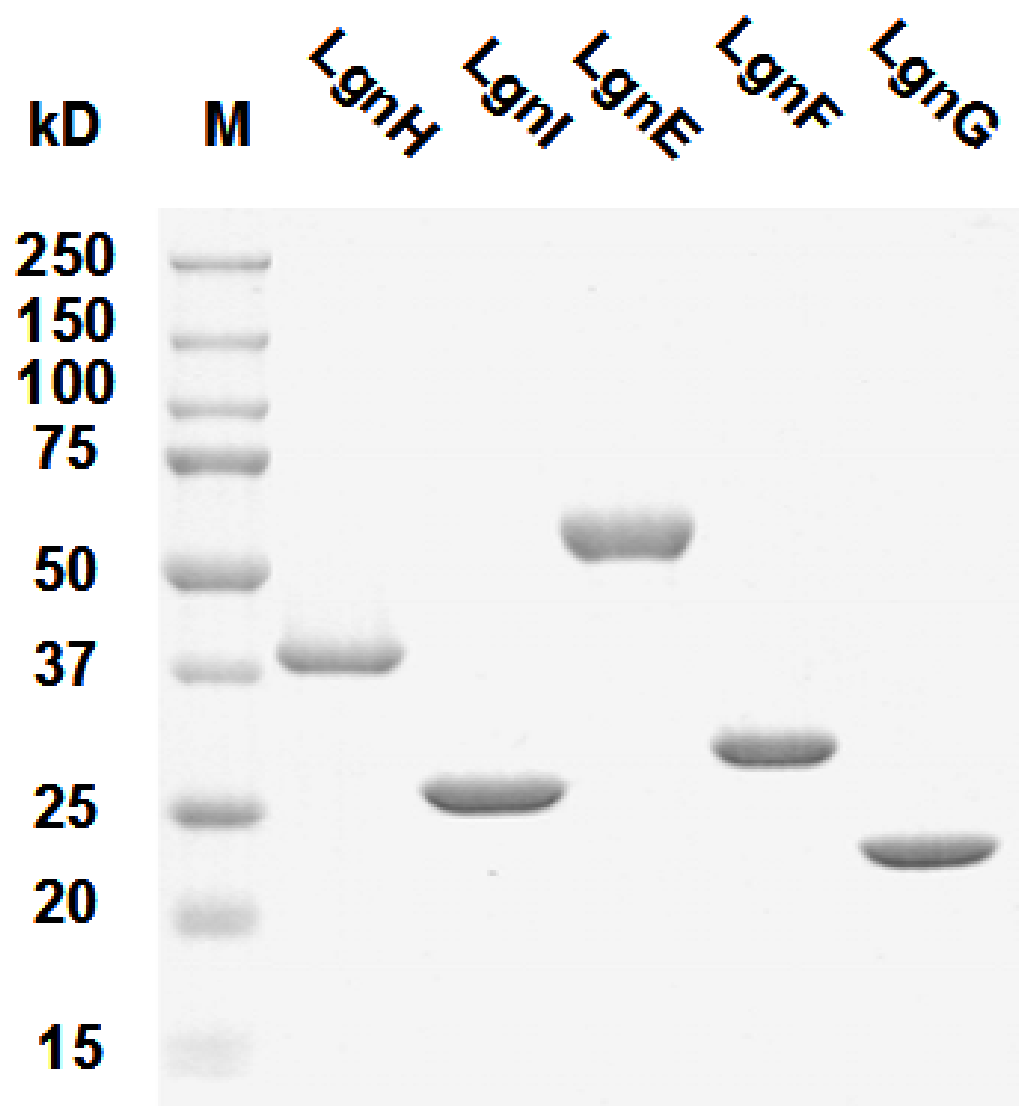


Figure 4-5-1. SDS-PAGE of purified recombinant Lgn proteins. Lane M, molecular marker; lane 1, His₆-LgnH; 2, His₆-LgnI; 3, His₆-LgnE; 4, His₆-LgnF; 5, His₆-LgnG.

Table 4-5-1. Kinetic parameters of dehydrogenase reaction of His₆-LgnH with various substrates.

| Substrate | K_m (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹) |
|-------------------|-------------------|--------------------------------|---|
| L-gluconate | 0.659 ± 0.023 | 573 ± 5 | 869 |
| L-galactonate | 0.224 ± 0.011 | 178 ± 2 | 828 |
| L-mannonate | - | n.d. | - |
| D-gluconate | - | n.d. | - |
| D-galactonate | - | n.d. | - |
| D-idonate | - | n.d. | - |
| NAD ⁺ | 0.155 ± 0.006 | 543 ± 4 | 3500 |
| NADP ⁺ | - | n.d. | - |

Table 4-5-2. ^1H and ^{13}C chemical shifts of the LgnH reaction product.

| | δ (ppm) | | | δ (ppm) |
|----|----------------|--------|----|-----------------|
| H2 | 4.604 (4.597) | 1H, d | C1 | 178.71 (179.34) |
| H3 | 4.423 (4.419) | 1H, dd | C2 | 81.99 (81.98) |
| H4 | 4.115 (4.112) | 1H, d | C3 | 78.99 (78.98) |
| H6 | 3.649 (3.644) | 2H, s | C4 | 78.77 (78.74) |
| | | | C5 | 105.75 (105.74) |
| | | | C6 | 66.34 (66.33) |

* Chemical shifts of the authentic potassium 5-keto-D-gluconate are shown in bracket.

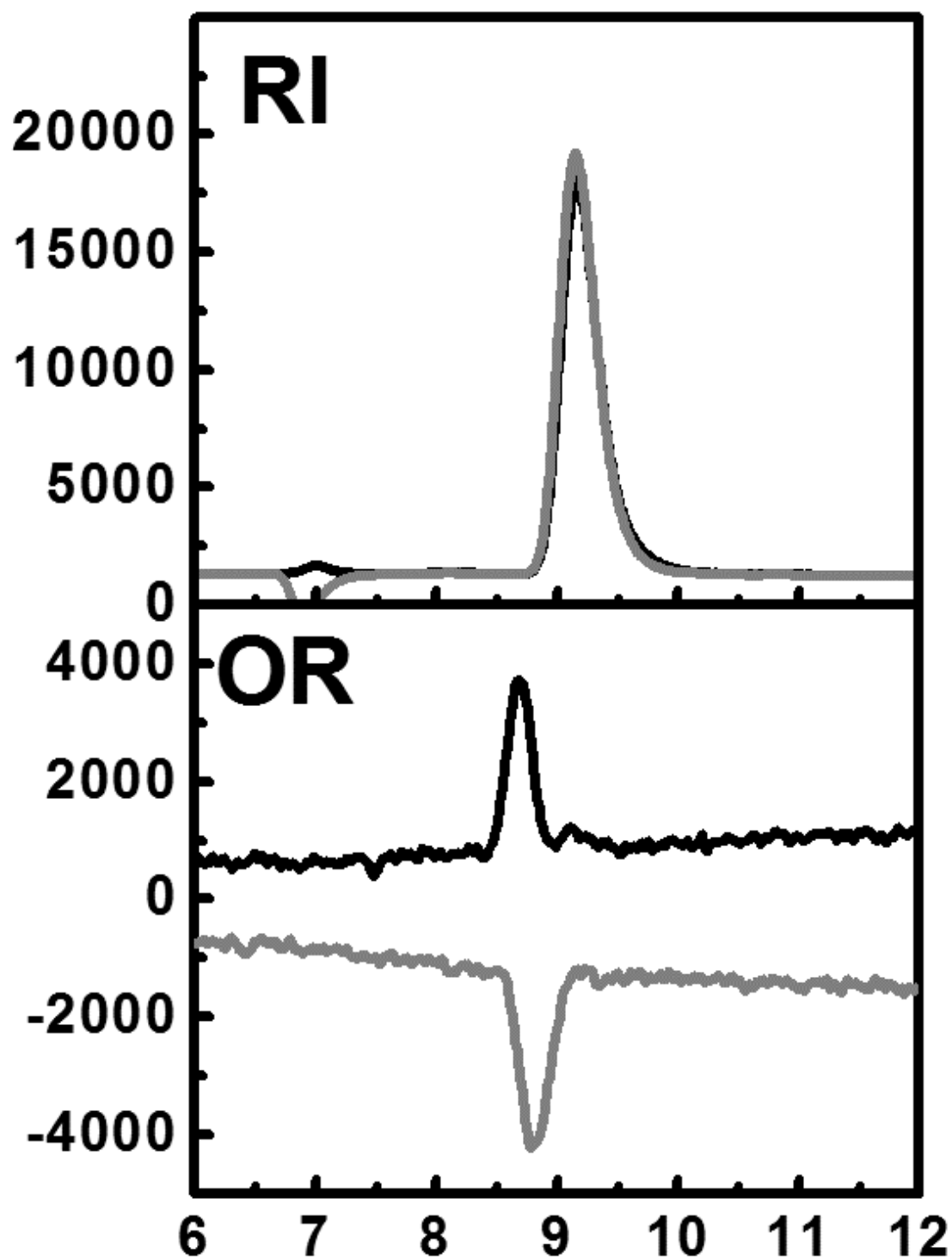


Figure 4-5-2. HPLC analysis of LgnH reaction product detected by a refractive index (RI) and chiral detector (OR). Black and gray lines indicate chromatograms of the LgnH reaction product and authentic potassium 5-keto-D-gluconate, respectively.

Table 4-5-3. Kinetic parameters of His₆-LgnI with various substrates.

| Substrate | K_m (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹) |
|-------------------------------|---------------|--------------------------------|---|
| <i>Reductase activity</i> | | | |
| 5-keto-L-gluconate | 0.180 ± 0.020 | 1200 ± 33 | 6640 |
| 5-keto-D-gluconate | - | n.d. | - |
| <i>Dehydrogenase activity</i> | | | |
| D-idonate | 12.7 ± 0.6 | 1740 ± 37 | 137 |
| D-gluconate | - | n.d. | - |
| D-galactonate | - | n.d. | - |
| L-gluconate | - | n.d. | - |
| L-galactonate | - | n.d. | - |
| L-mannonate | - | n.d. | - |

Table 4-5-4. ^1H and ^{13}C chemical shifts of the LgnI reaction product.

| | δ (ppm) | | | δ (ppm) |
|-----|----------------|---------|----|-----------------|
| H2 | 4.129 (4.128) | 1H, d | C1 | 181.30 (181.29) |
| H3 | 4.007 (4.007) | 1H, dd | C2 | 75.08 (75.08) |
| H4 | 3.731 (3.732) | 1H, dd | C3 | 75.37 (75.37) |
| H5 | 3.851 (3.852) | 1H, ddd | C4 | 74.46 (74.46) |
| H6 | 3.702 (3.703) | 1H, dd | C5 | 73.80 (73.80) |
| H6' | 3.660 (3.661) | 1H, dd | C6 | 65.75 (65.75) |

* Chemical shifts of the authentic sodium D-idonate are shown in bracket.

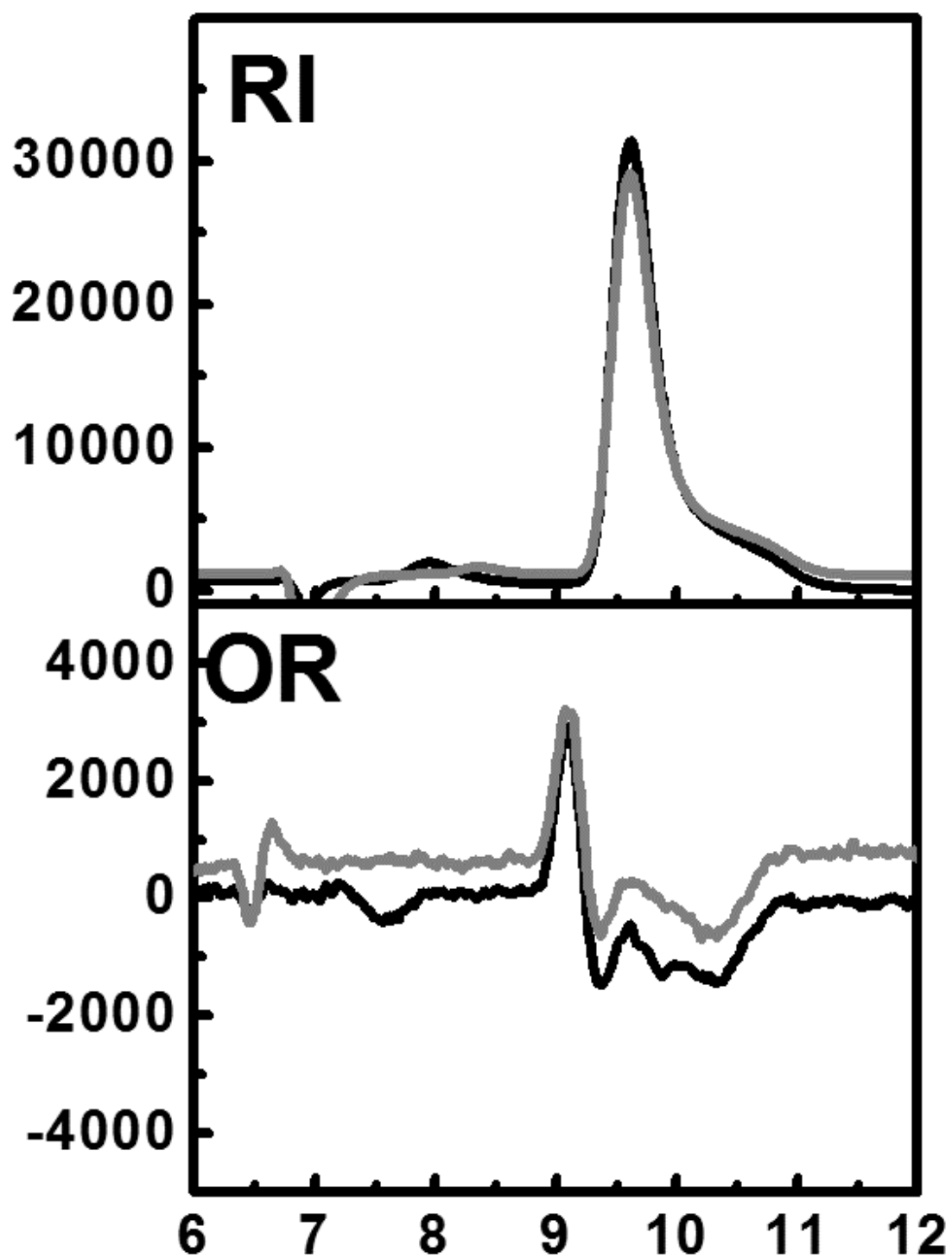


Figure 4-5-3. HPLC analysis of LgnI reaction product detected by a refractive index (RI) and chiral detector (OR). Black and gray lines indicate chromatograms of the LgnI reaction product and authentic sodium D-idonate, respectively.

Table 4-5-5. ^1H and ^{13}C chemical shifts of the LgnE reaction product.

| | δ (ppm) | | | δ (ppm) |
|-----|----------------|---------|----|-----------------|
| H3 | 1.773 (1.774) | 1H, d | C1 | 178.94 (178.91) |
| H3' | 2.145 (2.144) | 1H, dd | C2 | 99.31 (99.30) |
| H4 | 3.842 (3.841) | 1H, dd | C3 | 41.66 (41.63) |
| H5 | 3.587 (3.586) | 1H, ddd | C4 | 71.64 (71.62) |
| H6 | 3.589 (3.588) | 1H, dd | C5 | 73.39 (73.37) |
| H6' | 3.784 (3.786) | 1H, dd | C6 | 65.64 (65.63) |

* Chemical shifts of the authentic potassium KDGal are shown in bracket.

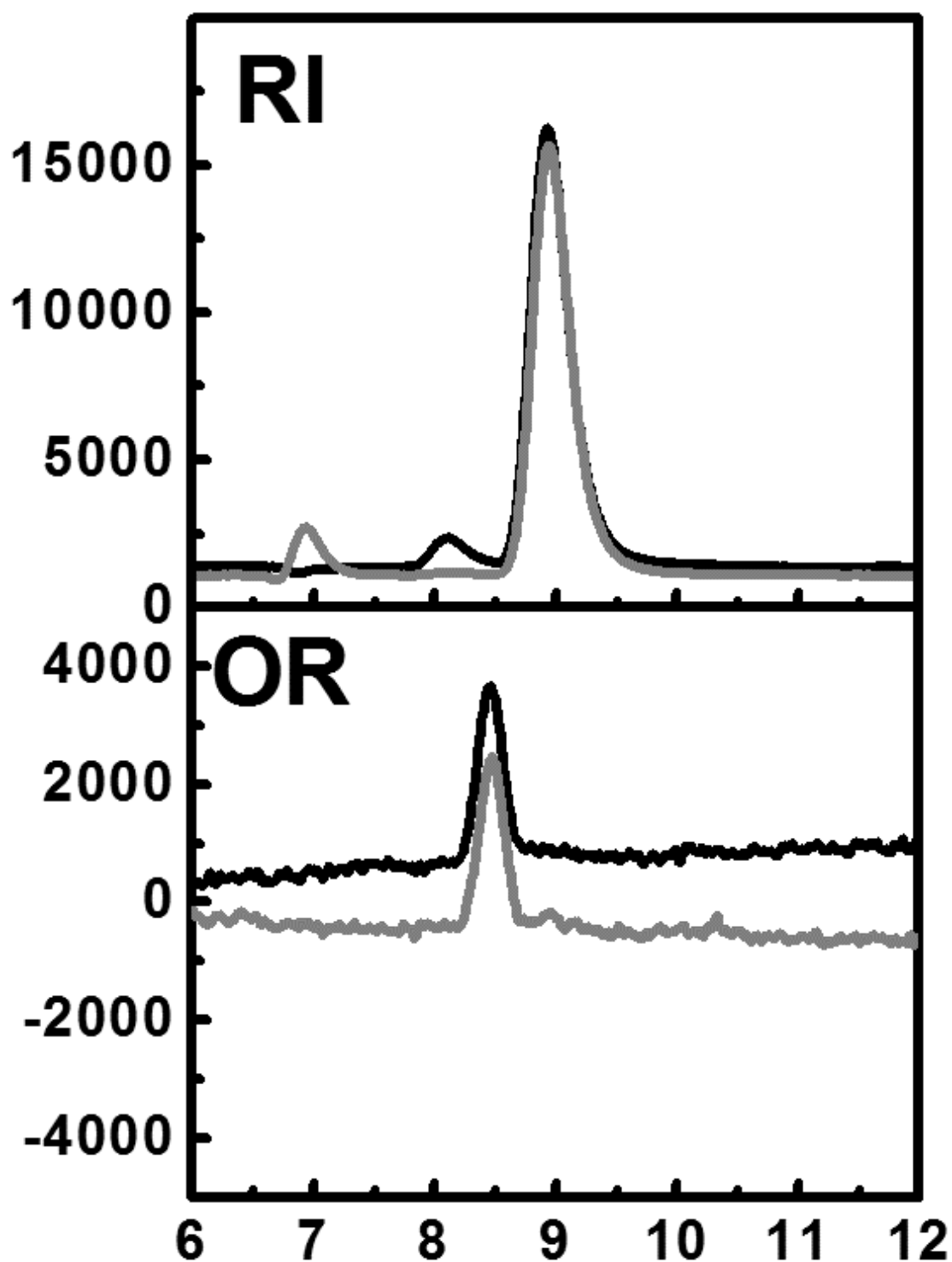


Figure 4-5-4. HPLC analysis of LgnE reaction product detected by a refractive index (RI) and chiral detector (OR). Black and gray lines indicate chromatograms of the LgnE reaction product and authentic potassium 2-keto-3-deoxy-D-galactonate, respectively.

Table 4-5-5. Kinetic parameter of His₆-LgnG.

| Coupling Enzyme | K_m (mM) | k_{cat} (min ⁻¹) | k_{cat}/K_m (min ⁻¹ mM ⁻¹) |
|-----------------------|---------------|--------------------------------|---|
| GapDH | 0.466 ± 0.012 | 3900 ± 31 | 8370 |
| Lactate dehydrogenase | 0.587 ± 0.023 | 4290 ± 270 | 7310 |

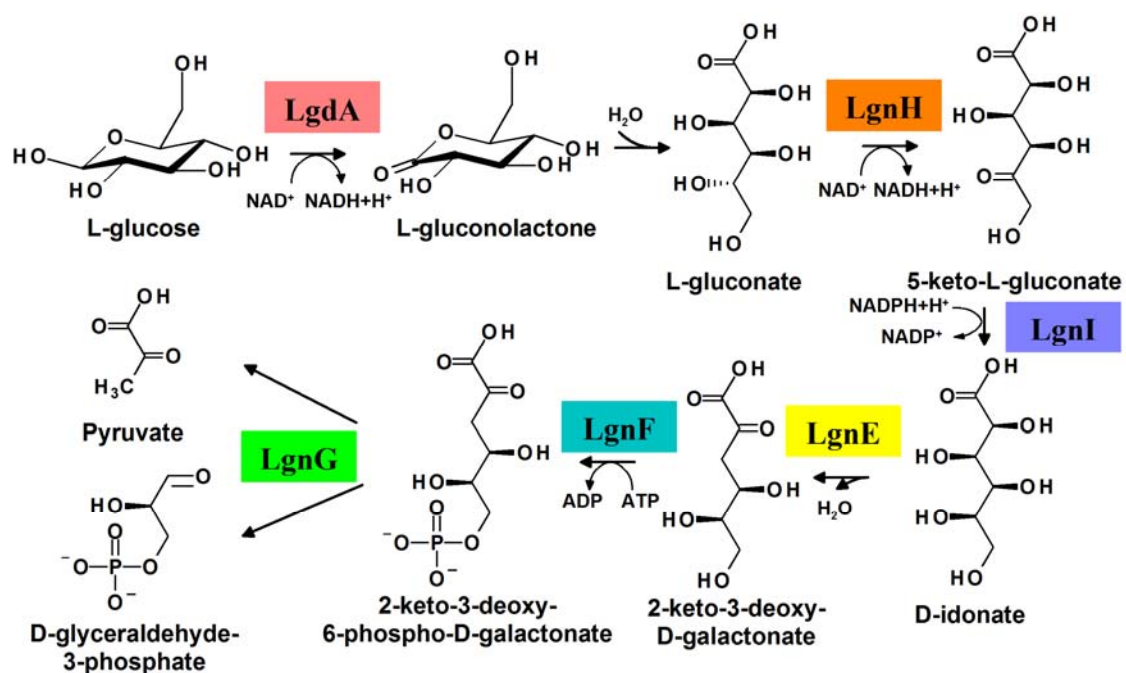


Figure 4-5-5. Model of L-glucose catabolic pathway in *Paracoccus* sp. 43P based on the result of recombinant enzyme analyses.

第六節 まとめと考察

本章では *Paracoccus* sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路に関与することが推察される酵素、L-gluconate dehydrogenase (LgnH) を同株より精製し遺伝子のクローニングを行い、周辺遺伝子の機能解析をあわせて行った。前述のように L-gluconate もまた L-glucose と同様に生物による分解、資化はもとより、自然界での存在すら確認されていない。そのため *Paracoccus* sp. 43P 株が L-gluconate を単一炭素源として生育できること、さらに L-gluconate を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を有する酵素が存在することは、興味深い結果である。

LgnH のアミノ酸配列は *E. coli* 由来の L-galactonate dehydrogenase (YjjN) と 30% の相同性を有しており、また His₆-LgnH は L-gluconate だけではなく L-galactonate を基質とした dehydrogenase 活性も有していた。このことから、同酵素は本来 L-galactonate 代謝に関わる可能性も予想されたが、L-galactonate を炭素源として 43P 株を培養した場合、その無細胞抽出液中の L-gluconate dehydrogenase 活性は非常に低いレベルであった。さらに、L-glucose、L-gluconate を炭素源とした場合には他の炭素源と比較して無細胞抽出液中の L-gluconate dehydrogenase 活性が顕著に増加する点から、*lgnH* は L-glucose、L-gluconate の存在により特異的に発現誘導される遺伝子であり、L-galactonate では発現誘導されないことが推察される。また次章でのべるように *lgnH* の破壊は L-galactonate を単一炭素源とした生育に影響を及ぼさない。

LgnI は LgnH の反応生成物である 5-keto-L-gluconate を、NADPH 依存的に還元し、D-idonate を生じるレダクターゼ活性を有する酵素である。反応は可逆的で、LgnI は NADP⁺ を補酵素とし、D-idonate を基質としたデヒドロゲナーゼ活性も有しているが、キネティックパラメーター解析からレダクターゼ活性はデヒドロゲナーゼ活性に対して約 50 倍強いことが明らかとなった。このことから、LgnI は 5-keto-L-gluconate から D-idonate を生じるレダクターゼとして実質的に機能することが推察される。LgnI は *Dickeya dadantii* 3937 由来の 2-keto-3-deoxy-D-gluconate-5-dehydrogenase と 40% のアミノ酸配列相同性を示すものの、2-keto-3-deoxy-D-gluconate を基質とした活性は有していなかった。このことから、LgnI は新規な基質特異性を有する short chain dehydrogenase ファミリーのタンパク質である。

LgnE は D-idonate から KDGal への脱水反応を触媒する酵素であり、そのアミノ酸配列は *E. coli* の galactarate dehydratase (Blumenthal *et al.* 1964) と 39% の相同性を示した。一方で LgnE は meso-galactarate を基質とした活性は有しておらず、新規な基質特異性を有する酵素であった。基質特異性解析の結果 LgnE は D-idonate のほかに L-gluconate、L-galactonate といった炭素数 6 のアルドン酸を基質とした活性を有しており、これらのアルドン酸は C2、C3 の水酸基の立体配置に共通性が見られることから、同部位の立体配置が基質認識に重要であることが推察された。アルドン酸を基質とした脱水反応を触媒する酵素としては、D-galactonate dehydratase (DgoD) (Babbitt *et al.* 1995) に代表されるエノラーゼスーパーファミリーに属するものや、6-phosphogluconate dehydratase (Edd) (Meloche *et al.* 1964) に代表され

る ILVD/EDD ファミリーに属するものについては結晶構造が明らかとなっており、その反応機構について詳細な解析がなされている。一方で galactarate dehydratase や LgnE のように活性に Fe^{2+} を要求するタイプのデヒドラターゼに関しては研究例が非常に少なく (Dreyer 1987)、その反応機構の詳細は不明である。それどころか Fe^{2+} 要求性デヒドラターゼ全長の異種発現は本研究が初めての例であるため、本研究により構築された LgnE の異種発現、精製系は Fe^{2+} 要求性デヒドラターゼの生化学的解析を行ううえで重要な知見となるだろう。

LgnF、LgnG は *E. coli* の DgoK、DgoA とそれぞれ 33%、40% のアミノ酸配列相同性を示し、酵素活性についても同様の反応を触媒するので、酵素としては新規なものではない。しかしながら DgoK、DgoA は *E. coli*、*Mycobacteria* においては D-galactonate 代謝において機能することが知られている (Deacon *et al.* 1977, Szmiłło 1981)。すなわち D-galactonate は D-galactonate dehydratase (DgoD) により KDGal に変換されるため、生成した KDGal は DgoK によって KDPGal に変換された後、DgoA によって pyruvate と D-glyceraldehyde-3-phosphate に変換される。従って生理的な役割という意味では LgnF、LgnG は DgoK、DgoA とはそれぞれ異なるものである。

Paracoccus sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路は全体として、L-glucose が酸化されてアルドン酸を生じる点、また代謝中間体として 2-keto-3-deoxy 糖酸を生じる点が古細菌に見られる非リン酸化型 Entner-Doudoroff 経路と共通しているものの、大きな相違点として L-gluconate の 5 位の水酸基の立体配置を LgnH、LgnI がそれぞれ触媒する酸化還元反応により変換し、D-idonate を生じる点が挙げられる。興味深いことに、このような 2 つの酸化還元酵素による D/L 変換は、本研究で見出された L-gluconate 以外にも、細菌における L-galactonate (Cooper 1978, Reed *et al.* 2006)、L-idonate (Bausch *et al.* 1998)、L-gulonate (Cooper 1980) といった炭素数 6 の L 体アルドン酸異化代謝経路において普遍的に見られるものであり、これらの代謝経路の最終産物は例外なく pyruvate と Gap である。D/L 変換の生理的な意義とは、これらの代謝系における最終段階、アルドール開裂反応の産物のひとつとして D 体の Gap を生じる点にあると考えられる。結果として生成した D 体の Gap は解糖系の下流に合流し、速やかに pyruvate に分解されその過程で 2 分子の ATP を基質レベルで生成することができる。一方で L 体の Gap は GapDH の基質とはならず、むしろ *E. coli* に対して殺菌的に作用することが知られている (Kalyananda *et al.* 1987)。従って L 体のアルドン酸を分解するためには D/L 変換が必要であり、この点で D 体の糖酸を代謝するよりも多くのステップを要するといえる。

Paracoccus sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路に見られる化合物のうち、本稿執筆時点で天然に存在しないと考えられているものは L-glucose のほかに、L-gluconate、D-idonate が挙げられる。従ってこれらを基質とした反応を触媒する LgnE、LgnH、LgnI の 3 つの酵素は新規な反応を触媒するものであり、安価な化合物からの新規化合物生産の可能性を秘めている。現在までのところ LgnE の逆反応は検出できないため、同酵素を用いて KDGal から D-idonate を生産することは現実的ではない。一方で 2013 年 1 月に報告された好熱性細菌、*Thermotoga*

maritima の新規 *myo*-inositol 代謝経路 (Radionova *et al.* 2013) には、本研究により新たに見出された中間代謝物、5-keto-L-gluconate が中間代謝物として生じる。従って *T. maritima* の *myo*-inositol 代謝に関わる酵素群と LgnH、LgnI、さらに既知酵素である uronate isomerase (UxaC) (Linster *et al.* 2004) を組み合わせることで、D-galacturonate、*myo*-inositol といった天然に豊富に存在する安価な化合物から L-gluconate、D-idonate を合成することが理論的には可能であり (Fig. 4-6-1)、今後検討する価値がある。

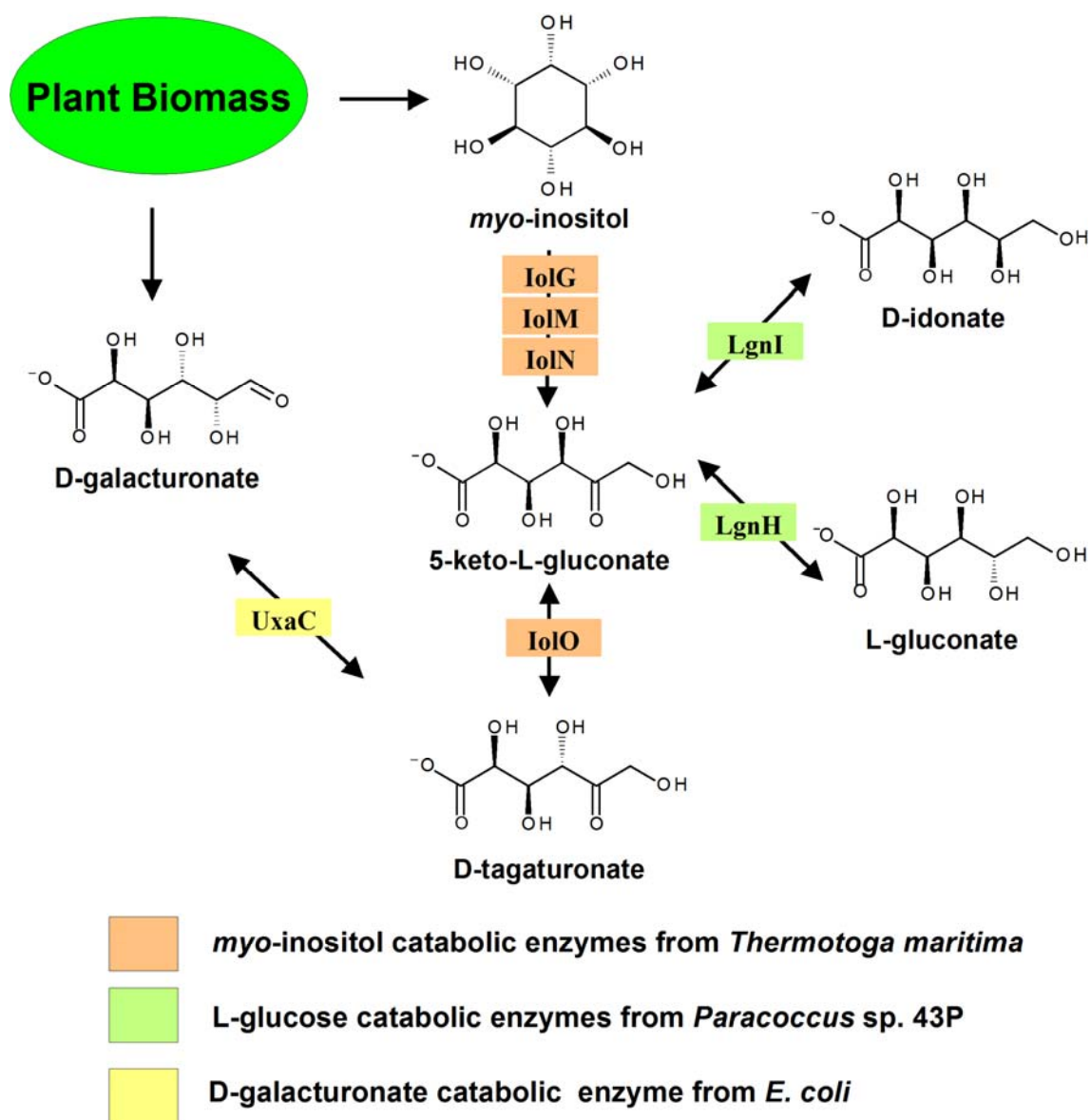


Fig. 4-6-1. Schematic representation of L-gluconate/D-idonate production from plant biomass.

第五章 L-グルコース代謝関連遺伝子の破壊とそれらの分子系統解析

第一節 緒言

前章までの結果から *Paracoccus* sp. 43P 株は *lgdA*、*lgnE*、*lgnF*、*lgnG*、*lgnH*、*lgnI* という 6 つの酵素遺伝子の機能により L-glucose を pyruvate と Gap に分解する可能性が示された。しかしながら Fig. 4-5-5 に示した推定 L-glucose 代謝経路はリコンビナント酵素を用いた *in vitro* の解析結果に基づくものである。従って予想された経路が実際に 43P 株の L-glucose 代謝で機能していることを示すためには、これらの遺伝子の破壊株を作製し、各遺伝子の破壊が L-glucose ないしは各種中間代謝物の資化性に及ぼす影響を検討する必要がある。そこで本章では 43P 株を宿主とした選択的な遺伝子破壊法について検討し、同株における推定 L-glucose 代謝関連遺伝子の破壊株を作製した。ついで各遺伝子の破壊が、L-glucose、L-gluconate、D-idonate を単一炭素源とした生育に及ぼす影響について解析を行った。さらに、43P 株の L-glucose 代謝関連遺伝子が他の生物のゲノムに保存されているのかという点について分子系統解析、リコンビナント酵素を用いた生化学的解析から検討を行った。

第二節 材料及び方法

5-2-1. 実験材料

使用培地

前培養には LB 培地を用いた。43P 株、*E. coli* S17-1 λ pir 株の抗生物質耐性の検討には LB 培地に各種抗生物質を以下の濃度で添加した: kanamycin (Km), 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$; ampicillin, 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$; chloramphenicol, 20 mg ml^{-1} ; gentamicin, 20 mg ml^{-1} ; amikacin, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; rifampicin, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$; tetracycline, 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$; nalidixic acid, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 。

43P 株の遺伝子破壊株の選択には 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の Km, 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$ の nalidixic acid を添加した LB 寒天培地を用いた。

生育試験には modified L-glucose minimal medium の炭素源をそれぞれ 10 mM L-glucose、10 mM potassium L-gluconate、10 mM sodium D-idonate、10 mM sodium L-galactonate、10 mM *myo*-inositol、10 mM *scyllo*-inositol としたものをを用いた。

使用プライマー

本章で用いたプライマーを Table 5-2-1 に示す。

5-2-2. 各種アルドン酸の合成

4-2-2 に従って行った。

5-2-3. 43P 株の抗生物質耐性の検討

LB 培地で一晚培養した 43P 株を各種抗生物質を添加した LB 培地に 2% (v/v) 植菌し、抗生物質を添加していない LB 培地中での生育と比較することで各抗生物質の効果を比較した。

5-2-4. 43P 株のエレクトロポレーション法による形質転換の検討

1) コンピテントセルの作製

200 ml LB 液体培地を用いて、30°C、120 rpm の条件で 43P 株を O.D. 600 nm が 0.7 付近となるまで培養し、遠心分離により集菌した。ついで氷冷した 20% (v/v) glycerol 30 ml で菌体を 2 回洗浄した後、400 μ l の 20% glycerol に菌体を懸濁し、オートクレーブにより滅菌したエッペンチューブに 60 μ l ずつ分注して -80°C で保存した。

2) エレクトロポレーション

コンピテントセルと 200 ng の pBBR1MCS2 を混和し、電圧を 2.0 kV としてエレクトロポレーションを行った。すぐに菌体を 1 ml の SOC 培地に懸濁し、シリコン栓でふたをした 15 ml 容ファルコンチューブを用いて 30°C、120 rpm で 3 時間回復培養を行った。回復培養液を SOC 培地を用いて 10^0 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} に希釈し、100 mg ml⁻¹ の Km を添加した LB 培地にプレーティングした。プレートは 30°C でインキュベートし、約 48 時間後に生育してきたコロニーをカウントし、形質転換体数を測定した。

5-2-5. 43P 株で利用可能な抗生物質耐性遺伝子マーカーの探索

pBR328 より chloramphenicol 耐性遺伝子、tetracycline 耐性遺伝子をプロモーター領域を含めて PCR 増幅し、それぞれ pBBR1MCS2 の *Sma*I サイトにクローニングした。得られたプラスミドを 43P 株にエレクトロポレーション法により導入し、5 μ g ml⁻¹ tetracycline hydrochloride、20 μ g ml⁻¹ chloramphenicol をそれぞれ添加した LB 寒天培地で選択することでこれらの抗生物質耐性遺伝子マーカーが 43P 株内で機能するか検討した。

5-2-6. 接合伝達による 43P 株の形質転換の検討

pBBR1MCS2 を保持させた *E. coli* S17-1 λ pir 株 (Simon *et al.* 1983) を 50 μ g ml⁻¹ の Km を含む LB 液体培地 5 ml で一晚 37°C、120 rpm で培養した。また 43P 株を 5 ml の LB 培地で 30°C、120 rpm にて一晚培養した。両培養液の O.D. 600 nm を 1.0 となるように LB 培地で希釈した後、*E. coli* S17-1 λ pir 株の培養液 150 μ l をエッペンチューブにとり、遠心分離により集菌して上清を除いた。ついでこのエッペンチューブに 43P 株の培養液 1.5 ml をとり、ボルテクスミキサーにより両菌体を混和した。ついでこの菌体懸濁液をメンブレンホルダー (0.2 μ m mixed cellulose membrane を敷く) を装着した 15 ml 容テルモシリンジに通液することで菌体をメンブレン上に集菌し、菌体がついた面を上にして抗生物質を添加していない LB 寒天培地上に、メンブレンとの間に空気が入らないよう置き、30°C で 7 時間インキュベートする

ことで接合伝達を行った。ついで LB 寒天培地よりピンセットを用いてメンブレンを取り、50 ml 容ファルコンチューブ内で 5 ml の LB 液体培地に接触させて、ボルテクスミキサーによって激しく攪拌することでメンブレンに付着した菌体を LB 液体培地に懸濁した。ついで同菌体懸濁液を LB 培地で 10^{-1} から 10^{-6} まで希釈し、 $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ Km、 $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ nalidixic acid を含む LB 寒天培地にプレーティングした。プレートは 30°C で 48 時間培養し、生育してきたコロニーをカウントして形質転換体数を測定した。

5-2-7. 遺伝子破壊用プラスミドの作製

接合伝達に必要な遺伝子であることが知られている *mob* を Mob_F、MobR のプライマーセットを用い、pBBR1MCS2 を鋳型として増幅した。この際、*mob* のプロモーター領域が伝達起点(*oriT*)として機能することが報告されている (Szpirer *et al.* 2001) ので、プロモーター領域を含めて PCR 増幅した。PCR には GC-rich PCR system (Roche)を用い、DMSO 濃度は 1 M とした。増幅産物を pGEM-T Easy vector system によりクローニングし、得られた pGEM-*mob* を *SphI*、*SalI* で制限酵素処理して pUC19 の *SphI*、*SalI* サイトに連結して pUC19-*mob* を得た。

43P 株のゲノム DNA を鋳型として LgdA1700_EcoF、LgdA1700_BamR、LgnH1500_EcoF、LgnH1500_BamR、LgnE2000_HinF、LgnE2000_XbaR のプライマーセットをそれぞれ用いた PCR を行い、増幅断片を電気泳動後にゲル抽出し、ついでプライマーに付加した適切な制限酵素で処理した後、pUC19 のマルチクローニングサイトにそれぞれ連結することで pUC19-*lgdA*、pUC19-*lgnE*、pUC19-*lgnH*、pUC19-*lgnI* を得た。

次に pBBR1MCS2 を鋳型として PkanF、kanR または Pkan_SacII F、kan_SacII R のプライマーセットを用いて PCR 増幅した Km 耐性遺伝子を、pUC19-*lgdA*、pUC19-*lgnH* の *SacII* サイトまたは pUC19-*lgnI*、pUC19-*lgnE* の *EcoRV* サイトにそれぞれ連結し、pUC19-*lgdA::kan*、pUC19-*lgnH::kan*、pUC19-*lgnI::kan*、pUC19-*lgnE::kan* を得た。

最後に pUC19-*lgdA::kan*、-*lgnH::kan*、*lgnI::kan*、*lgnE::kan* の *EcoRI* サイトに pUC19-*mob* を *EcoRI* で処理して切り出した *mob* カセットをそれぞれ連結し、pUC19-*lgdA::kan-mob*、-*lgnH::kan-mob*、*lgnI::kan-mob*、-*lgnE::kan-mob* を得た。

5-2-8. 接合伝達による遺伝子破壊株の作製

pUC19-*lgdA::kan-mob*、pUC19-*lgnH::kan-mob*、pUC19-*lgnI::kan-mob*、pUC19-*lgnE::kan-mob* をそれぞれ保持した *E. coli* S17-1 λ pir 株を供与菌、43P 株を受容菌とした接合伝達を 5-2-6 に従って行い、Km 耐性、nalidixic acid 耐性株をプレーティングにより選択した。ついで各耐性株を $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Km、 $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ nalidixic acid を添加した LB 液体培地にそれぞれ植菌し、一晚 30°C 、120 rpm で培養して生育が見られた株を遺伝子破壊候補株とし、それぞれからゲノム DNA を調製した。ついで得られたゲノム DNA を鋳型とした PCR を行い、PCR 反応液を 0.8%アガロースゲル電気泳動により分離することで、Km 耐性遺伝子の挿入に伴う増幅

断片の長さの増加を観察した。この際用いたプライマーは、遺伝子破壊に用いた相同領域より外側の配列から設計した。

5-2-9. 生育試験

5 ml の LB 液体培地で一晚培養した 43P 株および各遺伝子破壊株を集菌し、0.85%滅菌生理食塩水で 2 回洗浄した後、L-glucose、L-gluconate、D-idonate、L-galactonate、*scyllo*-inositol、*myo*-inositol (各 10 mM) をそれぞれ単一炭素源とした最少培地 10 ml に 1%植菌し、経時的に O.D. 600 nm の吸光度を測定した。

5-2-10. L-グルコース代謝関連遺伝子の分子系統解析

43P 株の L-glucose 代謝関連遺伝子のアミノ酸配列をもとに、KEGG ゲノムデータベース上でそれらと系統的に近いと推定されるタンパク質を選抜した。さらに UniProt KB データベースにおいて機能が明らかな”reviewed”タンパク質のうち Gfo/Idh/MocA (LgdA), zinc-containing ADH (LgnH), short chain dehydrogenase (LgnI), UxaA (LgnE), DGOK (LgnF), Aldolase_KDPG_KHG_2 (LgnG)ファミリーに属するものを選抜し、それらのアミノ酸配列を ClustalX2 によりそれぞれアラインした。ついで得られたアライメントファイルをもとに TreeView を用いてそれぞれ無根系統樹を作製した。

5-2-11. LgnH オルソログのリコンビナント酵素の調製

Escherichia coli W3110 株、*Bacillus subtilis* 168 株、*Ochrobactrum anthropi* 15819^T 株よりそれぞれ調製したゲノム DNA を鋳型として、Table 5-2-1 に示したプライマーセットを用いた PCR を行った。増幅断片をゲル抽出後 *Nde*I、*Xho*I で処理し、pET28a (+)の同サイトにそれぞれ連結し、pETyjjN、pETyjmD、pETOant_3903 を得た。作製したプラスミドをそれぞれ *E. coli* BL21 (DE3)にエレクトロポレーション法により導入し、得られた各タンパク質発現株より 4-2-9 にしたがって His₆-EcYjjN、His₆-BsYjmD、His₆-Oant_3903 を精製、保存した。

5-2-12. LgnH オルソログのキネティックパラメーターの測定

1) His₆-Oant_3903

100 mM Tris-HCl, pH 9.0, 1 mM NAD⁺, 0.5 μg His₆-Oant_3903 の反応溶液に基質として potassium L-gluconate または sodium L-galactonate を様々な濃度で添加して全量を 200 μl とし、室温で反応させた。酵素活性は NAD⁺の還元に伴う 340 nm の吸光度の上昇を DU800 spectrophotometer により測定した。

2) His₆-EcYjjN、His₆-BsYjmD

100 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 1 mM NAD⁺, 0.5 μg His₆-EcYjjN または His₆-BsYjmD に加えて基質として potassium L-gluconate または sodium L-galactonate を様々な濃度で添加して全量

を 200 μl とし、室温で反応させた。酵素活性は NAD^+ の還元に伴う 340 nm の吸光度の上昇を DU800 spectrophotometer により測定した。

Table 5-2-1. Primers used in this chapter.

| Primer | Sequence (5'-3') |
|---|-------------------------------------|
| Primers used for construction of suicide plasmids | |
| LgdA1700_EcoF | GGGGAATTCTTCCGGCATGAAHATCGTCG |
| LgdA1700_BamR | GGGGGATCCCTTCAGCGCCTTTTTCAGCG |
| LgnE2000_HinF | CAGAGAAGCTTATCAACGAAGCAAATCCGTC |
| LgnE2000_XbaR | GATGCTCTAGAGTCGATATAACCGGCCTCCA |
| LgnH1500_EcoF | GGGGAATTCGATCATCTCGGCTTATCAGG |
| LgnH1500_BamR | GGGGGATCCATAAGAAGCCATCGATGCGG |
| LgnI1500_XbaF | CAGTCATCTAGACTGCCGCTACAACAAAACGC |
| LgnI1500_SacIR | GACTGAGAGCTCGGTGTCAGAACGCGGATAGC |
| Pkan_SacIIF | CACAACCGCGGATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGA |
| Kan_SacIIR | CACAACCGCGGTTGGTCGGTCATTTCGAACC |
| Pkan_F | ATGTCAGCTACTGGGCTATCTGGA |
| Kan_R | TTGGTCGGTCATTTCGAACC |
| Mob_F | ACTCGCATAGGCTTGGGTCG |
| Mob_R | CTGGCAATTCCGGTTCGCTT |
| Primers used for confirmation of gene disruption | |
| lgdA_conF | AAGGACATCGAGGACGTGAT |
| lgdA_conR | ACGCTCGATTTTCGTCATTGC |
| lgnE_conF | AATGCCATGACGACAAACGC |
| lgnE_conR | TTTCCTCACCACGAATGACG |
| lgnH_conF | ATTCGGCATCGGAACCAACC |
| lgnI_conF | GCATGAAGGCGCTTATCATC |
| lgnI_conR | CGTGCTGACGGTACACCTCC |
| Primers used for construction of expression vectors | |
| YjmD_NdeF | GGCCCCATATGAAAGCGGTTCAAGTGCG |
| YjmD_XhoR | GGCCCCTCGAGTTAATCAAACGTGATGACGG |
| YjjN_NdeF | GGCCCCATATGTCTACGATGAATGTTTT |
| YjjN_XhoR | GGAAACTCGAGTCAGAAAGTAATTACGCCTT |
| Oant_3903_NdeF | GGCCCCATATGGTCAAAGCTCTGCGTAT |
| Oant_3903_XhoR | GGCCCCTCGAGTCAGTCGCGTTTCGATGATGA |

第三節 *Paracoccus* sp. 43P 株の遺伝子破壊方法の確立

5-3-1. 43P 株の生育を抑制する抗生物質の検討

43P 株を様々な抗生物質の存在下で培養した結果、 $50\ \mu\text{g ml}^{-1}$ Km, $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ ampicillin, $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ chloramphenicol, $5\ \mu\text{g ml}^{-1}$ tetracycline, $10\ \mu\text{g ml}^{-1}$ amikacin, $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicin の存在下で同株の生育は48時間以上抑制された (データ示さず)。一方で $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$ の nalidixic acid の存在下でも同株は良好な生育を示した (データ示さず)。

5-3-2. 43P 株で使用可能な抗生物質耐性マーカーの検討

43P 株の生育が Km によりある程度抑制されることが明らかとなったので、*Paracoccus* 属細菌で複製可能であることが報告されている広宿主域ベクターであり、マーカー遺伝子として Km 耐性遺伝子を有している pBBR1MCS2 を同株にエレクトロポレーション法により導入し、形質転換体を得られるか検討した。その結果 1×10^3 程度のコロニーが得られ、コロニーPCR により pBBR1MCS2 上の Km 耐性遺伝子の増幅が観察された。以上の結果から同株にエレクトロポレーションによりプラスミド DNA を導入可能であること、pBBR1MCS2 由来の Km 耐性遺伝子が同株でマーカー遺伝子として機能しうること、さらに pBBR ori が同株で複製されることが明らかとなった。

ついで pBBR1MCS2 のマルチクローニングサイトに pBR328 由来の tetracycline 耐性遺伝子、chloramphenicol 耐性遺伝子をそれぞれ導入したプラスミド、pBBR1-tet と pBBR1-cat を 43P 株に導入して2つのマーカーが機能するか検討した。その結果 pBBR1-tet を導入した 43P 株は1週間程度でコロニーを形成した (データ示さず)。このことから tetracycline 耐性遺伝子は 43P 株で機能しうるが、43P 株にとって tetracycline の効果が強すぎる、または tetracycline 耐性遺伝子の発現量が低すぎるため、マーカー遺伝子として利用するには適切ではないと判断した。pBBR-cat を導入した 43P 株は約 48 時間でコロニーを形成することができたが、pBBR1MCS2 の lac プロモーターに対して逆向きに chloramphenicol 耐性遺伝子を挿入した pBBR1-catRV では形質転換体を得られなかった (データ示さず)。このことから、pBR328 由来の chloramphenicol 耐性遺伝子プロモーターが 43P 株では機能しないことが考えられた。以上の結果から 43P 株で使用可能な抗生物質耐性遺伝子マーカーとしては、pBBR1MCS2 由来の Km 耐性遺伝子が最も便利であると結論した。

5-3-3. 接合伝達の検討

43P 株の場合、エレクトロポレーション法では 1×10^3 程度の形質転換体しか得られないため、相同組み換えによる遺伝子破壊を実施するには不十分であることが予想された。そこで pBBR1MCS2 を保持させた *E. coli* S17-1 λ pir 株を供与菌とした接合伝達について検討したところ、1回の操作で 1×10^5 の形質転換体を得ることが出来た。

第四節 L-グルコース代謝関連遺伝子の破壊が及ぼす影響

5-4-1. 43P 株の L-glucose 代謝関連遺伝子破壊株の作製

pBBR1MCS2 由来の Km 耐性遺伝子の両端に、L-glucose 代謝関連遺伝子の各 ORF の前後半それぞれに対応する 500 bp 以上の相同領域を付加したスーサイドプラスミドを接合伝達により 43P 株に導入し、Km 耐性となった株を選抜した結果、*lgdA*、*lgnH*、*lgnI*、*lgnE* の破壊株をそれぞれ取得することができた。正しく破壊されていることは、各遺伝子に対するプライマーを用いた PCR により確認した (Figure 5-4-1)。

5-4-2. L-glucose 代謝関連遺伝子の破壊が L-glucose 代謝に及ぼす影響

作製した破壊株を L-glucose 最少培地で培養した結果、野生株が生育するのに対して Δ *lgdA*、 Δ *lgnH*、 Δ *lgnI* 株は生育が見られなくなり、 Δ *lgnE* 株は野生株と比較して若干の生育速度の低下が観察された (Fig. 5-4-2A)。以上の結果からこれらの遺伝子が同株の L-glucose 代謝に関わることが示された。一方で L-gluconate を単一炭素源とした場合、 Δ *lgnH*、 Δ *lgnI* 株は生育が見られないのに対し、 Δ *lgdA* 株は野生株と同様の生育を示した (Fig. 5-4-2B)。このことから、LgdA が実際に L-glucose から L-gluconate への変換を触媒する酵素として 43P 株で機能していることが示された。さらに下流の中間代謝物と推定される D-idonate を単一炭素源とした場合は、 Δ *lgnE* 株で野生株と比較して顕著な生育の悪化が観察されたが、他の破壊株は野生株と同様の生育を示した (Fig. 5-4-2C)。このことから、LgnH、LgnI が、43P 株内で L-gluconate から D-idonate への変換を触媒する酵素として機能していることが示された。以上の結果から Figure 4-5-5 に示した経路が、実際に 43P 株の L-glucose 代謝で機能していることが示された。

続いて各遺伝子の破壊が L-gluconate の 4 位のエピマーに相当する L-galactonate を単一炭素源とした生育に影響をおよぼすか検討した結果、すべての遺伝子破壊株は L-galactonate を単一炭素源とした最少培地中で野生株と同様の生育を示した (Fig. 5-4-2D)。このことから、これらの遺伝子は L-galactonate 代謝には中心的には関与しておらず、43P 株の L-galactonate 代謝には別の遺伝子が関与していることが示唆された。また Δ *lgnH*、 Δ *lgnI*、 Δ *lgnE* 破壊株は *scyllo*-inositol、*myo*-inositol を単一炭素源とした培地で野生株と同様の生育を示した (Fig. 5-4-2E) 一方で、 Δ *lgdA* 株は *scyllo*-inositol を単一炭素源とした場合にのみ顕著な生育の悪化が観察された (Fig. 5-4-2F)。この結果から LgdA は L-glucose 代謝だけではなく、*scyllo*-inositol 代謝においても機能していることが示された。また、*lgn* 遺伝子群は inositol 異性体の代謝に必須ではないことが示された。

第五節 L-グルコース代謝関連遺伝子の分子系統解析

5-5-1. L-グルコース代謝関連遺伝子のアミノ酸配列に基づく分子系統解析

43P 株の L-glucose 代謝関連酵素のアミノ酸配列と、KEGG、UniProt データベース中の既知タンパク質アミノ酸配列の分子系統樹を作製した結果、L-glucose 代謝にかかわる酵素はいずれも機能の分かっているもの (UniProt データベースにおける”reviewed”タンパク質) とは根に近い部分で分岐しており、ゲノム配列の解析結果から推定された機能未知のタンパク質群とクラスターを形成した (Fig. 5-5-1)。また、いずれの酵素も *Paracoccus denitrificans* PD1222 株由来のタンパク質と分子系統的に最も近縁であった。この結果は 43P 株が *Paracoccus* 属に属することからも頷ける結果である。

さらに詳細に分子系統樹を見てみると、LgdA、LgnF、LgnG は *Alphaproteobacteria* 由来の機能未知タンパク質とクラスターを形成していた。これは *Paracoccus* 属が *Alphaproteobacteria* に属することからも妥当だと考えられる。それに対して、LgnE は *Betaproteobacteria* 由来の機能未知タンパク質群とクラスターを形成し、LgnH、LgnI は *Bacteroidetes* 由来のタンパク質群とクラスターを形成する傾向が見られた。このことから LgnE、LgnH、LgnI は別の分類群に由来すると考えることができ、*lgn* 遺伝子群、ひいては 43P 株の L-glucose 代謝の成り立ちを考える上で興味深い。

5-5-2. LgnH オルソログの酵素学的解析

分子系統解析の結果 LgnH のオルソログであると推定された *E. coli* 由来の YjjN、*Bacillus subtilis* 由来の YjmD、*Ochrobactrum anthropi* 由来の Oant_3903 のリコンビナント酵素を作製し、HisTrap カラムにて SDS-PAGE 上で単一バンドとなるまで精製し (データ示さず)、それぞれ L-gluconate、L-galactonate を基質とした活性を測定した。この際、His₆-EcYjjN、His₆-BsYjmD は反応至適 pH が 7.0-7.5 であったのに対して、His₆-Oant_3903 の反応至適 pH は LgnH と同様に pH 9.0-9.5 であった (データ示さず)。キネティックパラメーターを測定した結果、すべてのリコンビナント酵素が L-gluconate、L-galactonate を基質とした NAD⁺ 依存的な dehydrogenase 活性を有していた (Table 5-5-1)。しかしながら His₆-BsYjmD、His₆-EcYjjN の L-gluconate を基質とした活性は、それぞれの L-galactonate を基質とした活性に比べ弱いものだった。EcYjjN は実際に L-galactonate 代謝に関与することが既に示されているので、この結果は妥当なものであるが、BsYjmD の生理機能については不明である。一方で His₆-Oant_3903 は L-gluconate、L-galactonate 双方に対して同程度の活性を有していた。

5-5-3. Oant_3903 の機能解析

Ochrobactrum anthropi は L-gluconate を単一炭素源として生育できなかった一方で、L-galactonate を炭素源とした生育は観察された (データ示さず)。L-galactonate を炭素源として培養した同株より無細胞抽出液を調製し、NAD⁺ 依存的な L-galactonate dehydrogenase、

L-gluconate dehydrogenase 活性をそれぞれ測定した結果、いずれの活性も検出された (Table 5-5-2)。このことから、Oant_3903 は同株内で L-galactonate dehydrogenase として機能していることが示唆された。

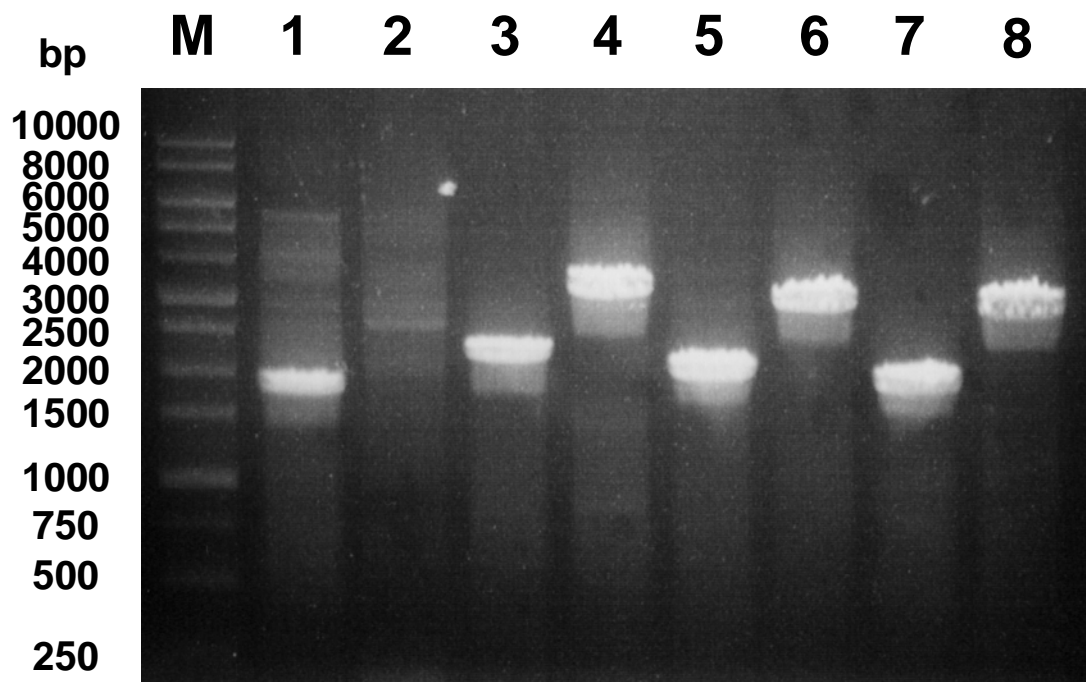


Figure 5-4-1. PCR analysis of gene disruption mutants. PCR reactions for amplifying *lgdA* (lanes 1 and 2), *lgnE* (3 and 4), *lgnH* (5 and 6), and *lgnI* (7 and 8) were conducted with primer pairs described in Table 5-2-1 using strain 43P chromosomal DNA (lanes 1, 3, 5, and 7), Δ *lgdA* strain (2), Δ *lgnE* strain (4), Δ *lgnH* strain (6), and Δ *lgnI* strain (8) as templates. Lane M denotes molecular mass markers.

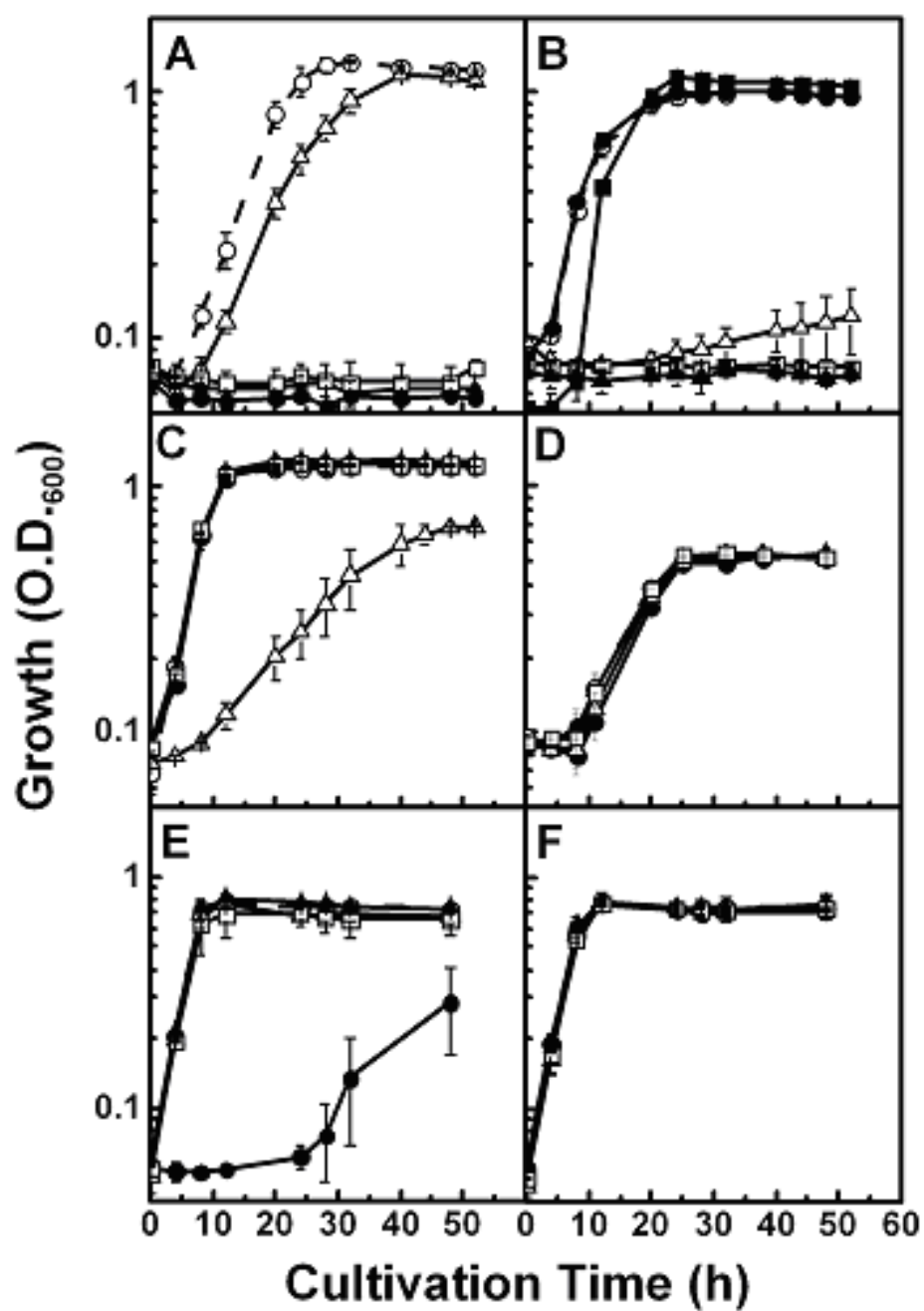
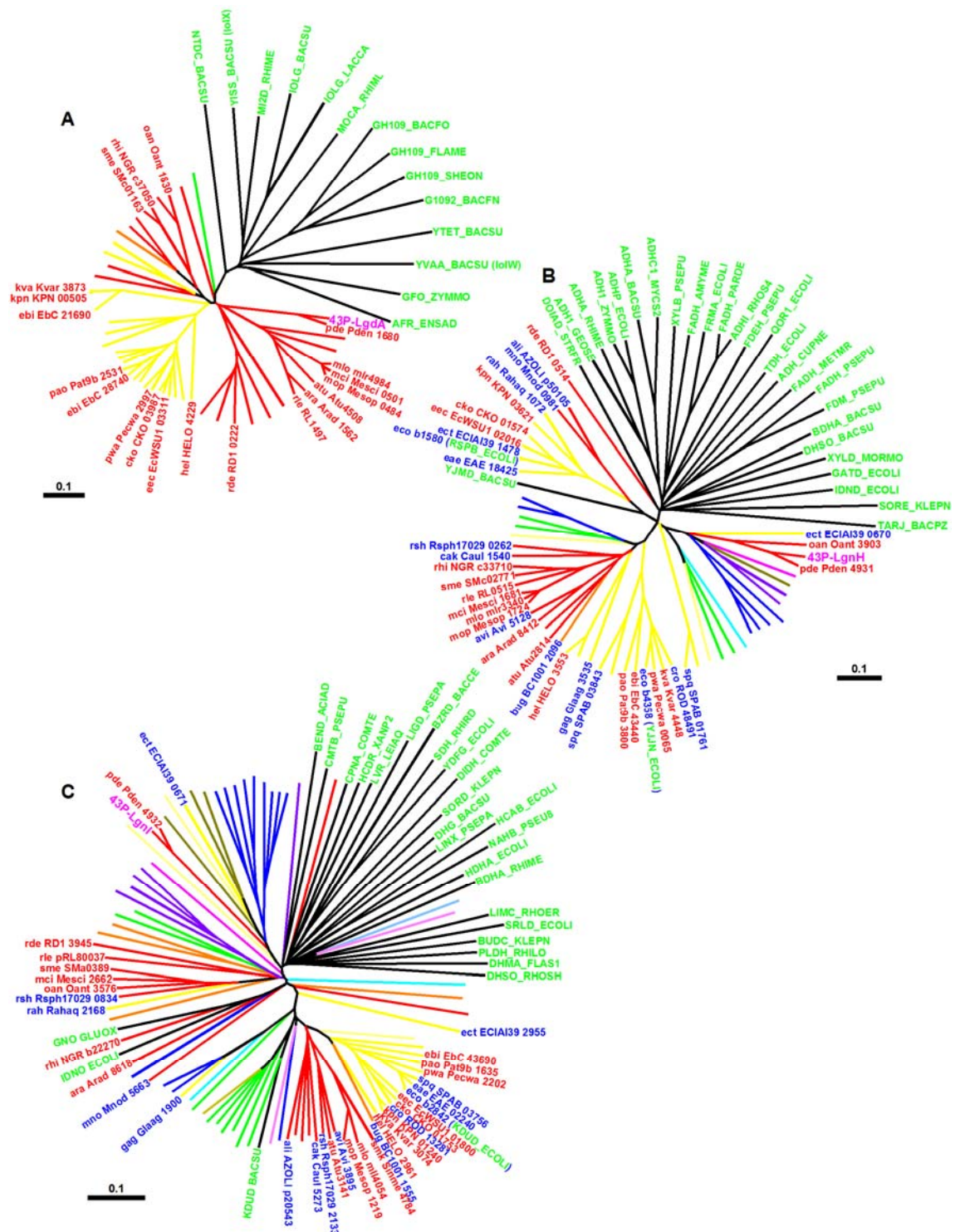


Figure 5-4-2. Growth of strain 43P and gene disruption mutants in minimal media containing L-glucose (A), L-gluconate (B), D-idonate (C), L-galactonate (D), *scyllo*-inositol (E), and *myo*-inositol (F). Open circles, strain 43P; closed circles, $\Delta lgaA$ strain; open triangles, $\Delta lgnE$ strain; closed triangles, $\Delta lgnH$ strain; open squares, $\Delta lgnI$ strain. In panel (B), the growth of strain NBRC 102528^T is also shown (closed squares). Cultivation was conducted in three independent cultures and average values \pm S. D. are shown.



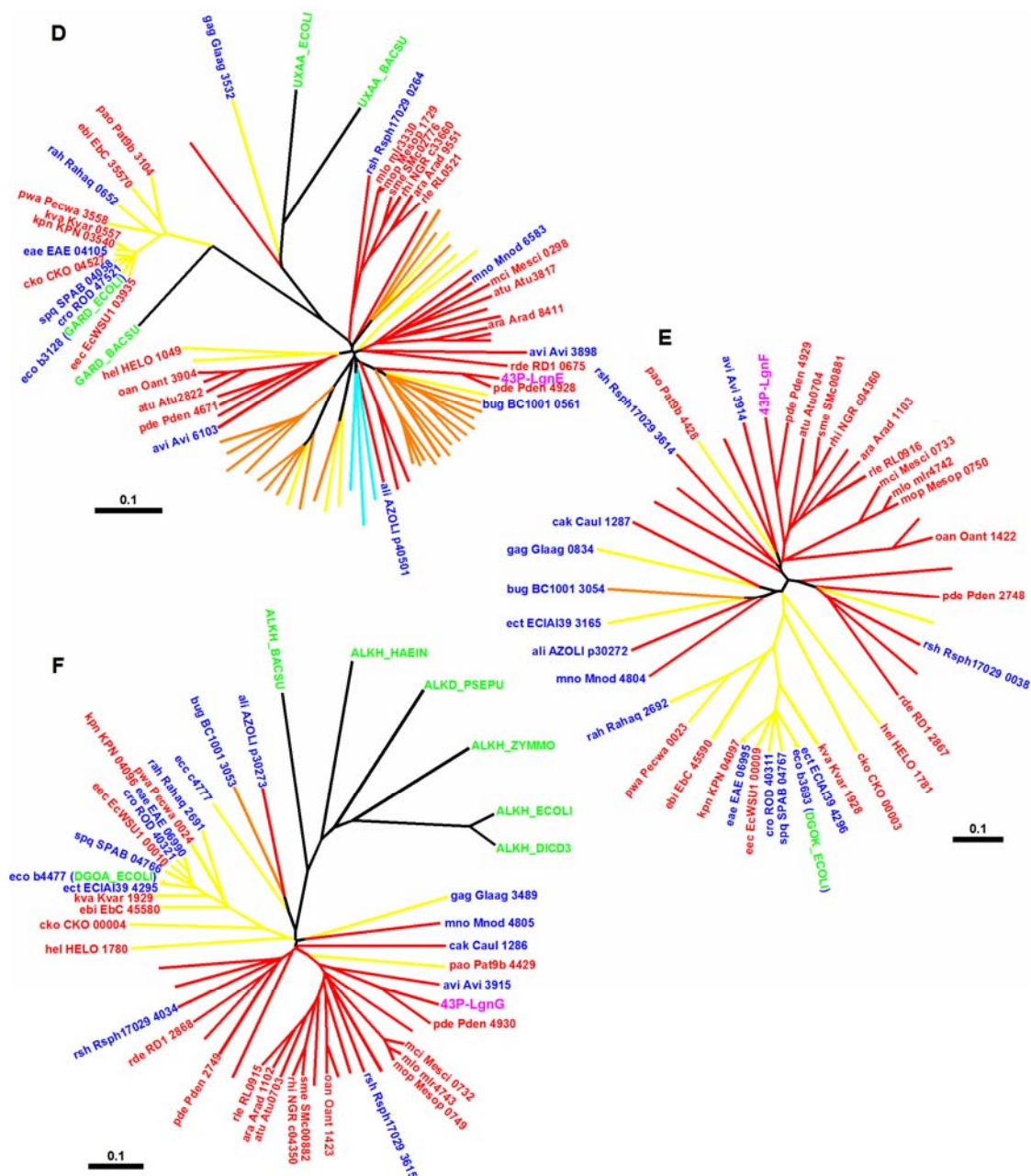


Figure 5-5-1. Phylogenetic trees based on the amino acid sequences of LgdA (A), LgnH(B), LgnI (C), LgnE (D), LgnF (E), and LgnG (F) and their related sequences from the KEGG genome and Uniprot KB databases. The sequences of enzymes with known function from respective protein families in the Uniprot KB database are shown in green with their accession numbers, and those of "potential" L-glucose and L-gluconate utilizing organisms from the KEGG genome database are shown in red and blue, respectively, with KEGG organisms and accession numbers. The other sequences from the KEGG genome database showing high similarities are indicated only with lines. Line colors denote affiliations of organisms with the KEGG organisms; red, orange, yellow and magenta, *Alpha*-, *Beta*-, *Gamma*- and *Deltaproteobacteria*; green, *Firmicutes*; cyan, *Actinobacteria*;

denim, *Chlamydiae*; cream, *Spirochetes*; purple, *Acidobacteria*; blue, *Bacteroidetes*; mustard, *Fusobacteria*; camel, *Verrucomicrobia*; and lilac, Hyperthermophilic bacteria. The bars represent 0.1 substitutions.

Table 5-5-1. Kinetic parameter of LgnH orthologs

| Protein | substrate | K_m (mM) | k_{cat} (min^{-1}) | k_{cat}/K_m ($\text{min}^{-1} \text{mM}^{-1}$) |
|-----------|---------------|-------------------|---------------------------------|--|
| LgnH | L-gluconate | 0.659 ± 0.023 | 573 ± 5 | 869 |
| | L-galactonate | 0.224 ± 0.011 | 178 ± 2 | 828 |
| Oant_3903 | L-gluconate | 0.309 ± 0.045 | 183 ± 5 | 592 |
| | L-galactonate | 1.04 ± 0.16 | 466 ± 18 | 448 |
| EcYjjN | L-gluconate | 4.64 ± 0.32 | 22.6 ± 0.4 | 5 |
| | L-galactonate | 0.287 ± 0.020 | 67.0 ± 1.4 | 230 |
| BsYjmD | L-gluconate | 10.2 ± 1.1 | 224 ± 1 | 22 |
| | L-galactonate | 0.184 ± 0.013 | $367 \pm$ | 1995 |

Table 5-5-2. NAD⁺ dependent dehydrogenase activity on cell-free extract from *Ochrobactrum anthopi* cultivated with L-galactonate

| Substrate ^a | Specific activity (μmol min ⁻¹ mg ⁻¹) |
|------------------------|--|
| L-gluconate | 0.058 |
| L-galactonate | 0.184 |

^a The activity was measured with a final concentration of 1 mM substrate

第六節 まとめと考察

本章では *Paracoccus* sp. 43P 株の遺伝子組換え方法について検討し、同株における推定 L-glucose 代謝関連遺伝子の破壊株を作製することに成功した。*Paracoccus* 属細菌の遺伝子破壊の例は少なく、同属で最も研究されている *Paracoccus denitrificans* PD1222 株も本研究と同様の手法により行われる。すなわち、スーサイドベクターを *E. coli* S17-1 λ pir、*E. coli* TG1 といった *tra* 保有株を供与菌とした接合伝達により導入し、相同組み換えによる薬剤耐性遺伝子の挿入により標的遺伝子が不活性化した株を選択する。この方法の大きな問題は、ダブルクロスオーバーにより目的の遺伝型となった株以外に、シングルクロスオーバーによってスーサイドベクター全体が染色体上に挿入された株も同様の薬剤耐性株として選択されてしまう点である。これらを選別するためには、個々の薬剤耐性株について PCR またはサザンハイブリダイゼーションによる遺伝型の確認を行う以外になく、コスト、スピードの両面で優れているとはいえないので、今後改良の余地があるだろう。

第三章で述べた LgdA の基質特異性の解析結果から予想されたとおり、 Δ lgdA 株は L-glucose を単一炭素源として生育できなただけではなく、*scyllo*-inositol を単一炭素源とした生育についても野生株と比較して顕著な悪化が観察された。この結果は *lgdA* が L-glucose と *scyllo*-inositol という異なる化合物両方の異化代謝に寄与していることを示すものである。古くから酵素は一つの基質に対して特異的に作用することで一つの生理機能を発現する“specialist”としての側面が注目されてきたが、近年では LgdA のように広い基質特異性、反応性を持つ“generalist”にも注目が集まっている。これは広範な基質特異性を生かした有用物質生産への応用という観点だけではなく、generalist の存在がタンパク質の進化を考えるうえで重要であるという認識が広がりつつあるためである。というのも、もともと基質 A に対して作用する酵素が directed evolution により基質 B に対して作用する新たな機能を獲得するとき、基質 A に対する活性の低下は多くの場合小さなものである (Khersonsky *et al.* 2006)。すなわち、酵素にとって新たな機能の獲得と、もともとの機能との間にあるトレードオフの関係は想像されていたよりも小さなものであり、その実験的事実は原始的な酵素は単独でいくつかの反応を触媒し、複数の生理機能に関与していたとする仮説 (Jensen 1976) を逆説的に裏付けるものであるといえる。そうした観点から、LgdA の広範な基質特異性が、43P 株に *scyllo*-inositol 資化、L-glucose 資化という 2 つの生理機能を付与するという事実は、酵素の分子進化と生理的な役割の変化を考える意味でも興味深いといえる。

Paracoccus 属細菌で唯一ゲノム配列が明らかとなっている *P. denitrificans* PD1222 株は *P. denitrificans* NBRC102528^T 株を親株とした変異育種により DNA 修飾機構を欠損し、接合伝達効率が向上した株である (Vries *et al.* 1989)。そのため PD1222 株が L-glucose 代謝関連遺伝子のオルソログをすべて有していることから、NBRC102528^T 株も L-glucose 代謝に関わるすべての遺伝子のオルソログを有していると推定される。しかしながら、NBRC102528^T 株は L-gluconate を単一炭素源として生育する一方で、L-glucose を単一炭素源として生育で

きなかった。同株の *lgdA* オルソログである Pden_1680 のリコンビナント酵素を用いて L-glucose を基質としたデヒドロゲナーゼ活性を測定した結果、 $k_{\text{cat}} = 836 \pm 12 \text{ min}^{-1}$ 、 $K_m = 78.0 \pm 8.2 \text{ mM}$ であり、LgdA と同程度の活性を示したことから、同株が L-glucose を資化できない原因は酵素活性ではなく、L-glucose を菌体内に取り込めない、Pden_1680 が発現していないといった可能性が考えられる。

ΔlgdA 、 ΔlgdH 、 ΔlgdI 株が L-glucose を単一炭素源として生育できなかった一方で、 ΔlgdE 株は野生株と比較して若干の生育速度の低下が観察されるものの、L-glucose を単一炭素源として生育することが可能であった。この原因として考えられるのが、*lgdE* のパラログの存在である。というのも、PD1222 株は *lgdE* オルソログである Pden_4928 のほか、同遺伝子と 53% のアミノ酸配列相同性を示すパラログ、Pden_4671 を有しているため、43P 株もまた *lgdE* のパラログを有しており、*lgdE* の機能を相補していることが推察される。

Lgn 酵素群による L-gluconate 代謝経路は、*E. coli* で報告のある L-galactonate 代謝経路と非常に良く似ている (Fig. 5-6-1)。両代謝経路とも 2 種の酸化還元酵素により 5 位の水酸基の立体配置を変換して D 体のアルドン酸を生じ、 Fe^{2+} 依存的デヒドラターゼにより 2-keto-3-deoxy 糖酸としたあと、続く kinase によるリン酸化、aldolase によるアルドール開裂反応により同じ最終産物、pyruvate と Gap を生じる。しかしながら LgnI、LgnF はそれぞれ UxaB、KdgK とアミノ酸配列相同性を示さず、また *lgd* 遺伝子群の破壊は 43P 株において L-galactonate を単一炭素源とした生育に影響を示さなかった。これらの結果は *lgd* 遺伝子群が既知の L-galactonate 代謝経路を担う酵素遺伝子群とは異なるものであり、L-gluconate 代謝に特化したものであることを示している。そして *lgd* 遺伝子群の存在は、天然における存在が観察されていない L-gluconate が実は存在する、または存在したことを示す遺伝的な証拠と考えることができるだろう。

先に述べた酵素における generalist、specialist という分類に基づいてみると、分子系統的に近い 2 つの酵素、LgnH と Oant_3903 は L-gluconate dehydrogenase としても L-galactonate dehydrogenase としても酵素活性の面では機能しうる generalist であるといえる。一方 LgnH は 43P 株内で L-gluconate 代謝でのみ機能するのに対して、Oant_3903 は *Ochrobactrum anthropi* 内で L-galactonate 代謝でのみ機能することから、それらの生理的な役割は異なるものであるといえる。二つの酵素は k_{cat}/K_m でみると L-gluconate、L-galactonate に対して同程度の値を有しているという点で共通しているが、その質には大きな違いがある。すなわち LgnH は L-gluconate に対して高い k_{cat} 、 K_m を有し、L-galactonate に対して低い k_{cat} 、 K_m を有しているのに対して、Oant_3903 は L-galactonate に対して高い k_{cat} 、 K_m を有しており、L-gluconate に対して低い k_{cat} 、 K_m を有している。この違いは両酵素がそれぞれの生理機能に適応していく過程を反映しているものと考えことができ、興味深い。一方で *Ochrobactrum anthropi* のゲノム DNA 上で Oant_3903 をコードする遺伝子が存在する遺伝子クラスターは、*lgd* 遺伝子群とは構成、順序ともに全く異なる (Fig. 5-6-2, Table 5-6-1)。従ってタンパク質機能の進化速度に対し、遺伝子クラスターの再構成、至適化はより速いものであるといえる。

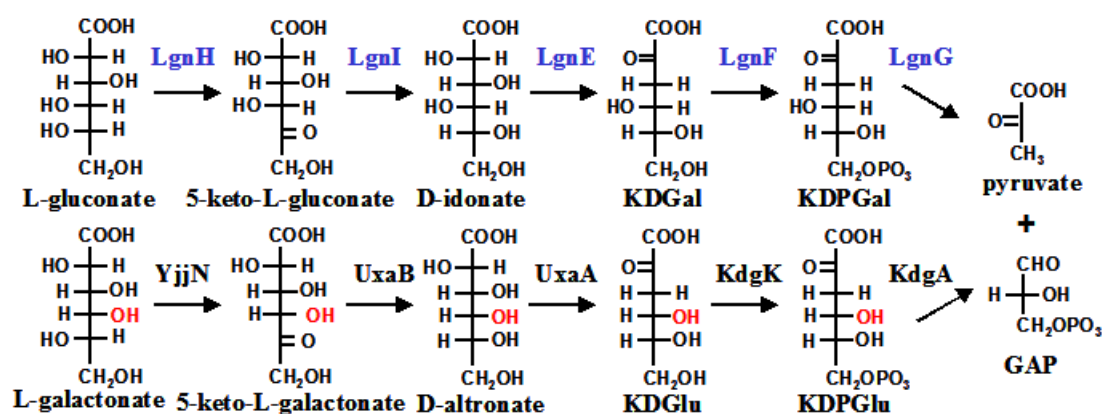


Figure 5-6-1. Schematic representation of L-gluconate and L-galactonate catabolic pathway.

Upper column, L-gluconate catabolic pathway in *Paracoccus* sp. 43P; lower column, L-galactonate catabolic pathway in *Escherichia coli*.

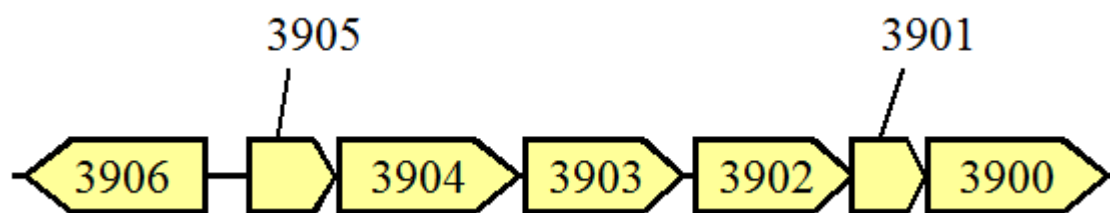


Fig. 5-6-2. Schematic representation of genomic locus containing Oant_3903 in *Ochrobactrum anthropi* 15819^T.

Table 5-6-1. Annotated functions of genes surrounding Oant_3903.

| Gene | Annotated function |
|-----------|---|
| Oant_3906 | tagaturonate reductase |
| Oant_3905 | GntR family transcriptional regulator |
| Oant_3904 | galactarate dehydratase |
| Oant_3903 | alcohol dehydrogenase |
| Oant_3902 | TRAP dicarboxylate transporter subunit DctP |
| Oant_3901 | tripartite ATP-independent periplasmic transporter DctQ |
| Oant_3900 | TRAP dicarboxylate transporter DctP subunit |

第六章 総括

D-glucose は自然界で最も多く存在する単糖であり、多くの生物の炭素源、エネルギー源として利用されている。一方でその鏡像異性体である L-glucose は、D-glucose と化学的、物理的に全く同じ性質を有しているにもかかわらず、自然界での存在は未だ確認されていない。これまでにカビ、酵母、ラット、真正細菌、古細菌などの様々な生物種が L-glucose を分解、資化出来るのか検討されてきたが、いずれの生物種も L-glucose を分解できず、生物は L-glucose を利用することが出来ないという認識が一般的なものとなりつつある。しかしながら、現在考えられている生物史以前の糖の生成・供給経路は、いずれも光学選択的なものではなく、原始の地球においては D-glucose と L-glucose が同程度の量存在した可能性を否定できない。それではなぜ、L-glucose ではなく D-glucose が生物によって選択され、生物は D-glucose のみに特化した代謝経路を発展させてきたのか？この根源的な問いに対する新たな知見を得るため、本研究は L-glucose を分解・資化することができる生物を環境中から探索することから始まった。

第二章では L-glucose を単一炭素源とした最少培地を用いた集積培養の結果、L-glucose を単一炭素源として生育できる細菌を単離することに成功し、16S rRNA 遺伝子配列解析による L-glucose 資化菌の同定を行った。その結果 L-glucose 資化菌はすべて α -Proteobacteria 網に属していた。この結果は一般的な認識として生物が分解できないといわれてきた L-glucose を分解、資化することが出来る微生物が存在することを示したという点で重要である。

第三章では単離した L-glucose 資化菌のうち最も強い L-glucose 資化能を有していた *Paracoccus* sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路の初段階反応として、NAD⁺依存的な L-glucose dehydrogenase 活性を見出し、同反応を触媒する酵素の精製、酵素遺伝子 *lgdA* のクローン化に成功した。ついでリコンビナント酵素を用いた基質特異性の解析、結晶構造解析から、LgdA は既知の酵素とは異なるユニークな基質特異性を有しており、L-glucose 以外にも様々な単糖、inositol 異性体を基質とした活性を有していた。ついで LgdA の反応産物の精製、HPLC、NMR による解析を行い、同酵素は L-glucose の 1 位の脱水素反応を触媒し、生成物として L-gluconate を生じることを示した。

第四章では LgdA の反応産物である L-gluconate を基質として NAD⁺を補酵素とした L-gluconate dehydrogenase 活性を *Paracoccus* sp. 43P 株の無細胞抽出液中に見出し、同反応を触媒する酵素の精製、酵素遺伝子 *lgnH* のクローン化、周辺遺伝子の解析を行った。さらに *lgnH* を含む遺伝子クラスター、*lgn* 遺伝子群における酵素遺伝子が大腸菌を宿主としてそれぞれ発現、精製し、酵素学的解析ならびに反応産物の同定を行った。その結果 LgdA により L-glucose より生成した L-gluconate は、2 つの酸化還元酵素、LgnH、LgnI により 5-keto-L-gluconate を経て D-idonate に変換され、ついで LgnE の触媒する脱水反応によって KDPGal となった後、LgnF によって 6 位に ATP 依存的なリン酸化を受け KDPGal に変換され、

最後に LgnG の触媒するアルドール開裂反応によって pyruvate と Gap となり前者は TCA サイクル、後者は解糖系に合流することが予想された。

第五章では接合伝達を用いた *Paracoccus* sp. 43P 株の形質転換方法について検討し、さらにカナマイシン耐性遺伝子の挿入による遺伝子破壊法を確立した。ついで *lgdA*、*lgnE*、*lgnH*、*lgnI* それぞれの破壊株を作製し、L-glucose、L-gluconate、D-idonate を単一炭素源とした生育を観察することにより前章までの *in vitro* の実験結果から予想された 43P 株の L-glucose 代謝経路が *in vivo* においても機能していることを示した。また L-glucose 代謝関連遺伝子の破壊は L-galactonate を単一炭素源とした生育に影響を与えず、*lgn* 遺伝子群が L-glucose、L-gluconate 代謝に特化した遺伝子群であることを示した。

本研究は L-glucose を分解、資化できる微生物を環境中から単離し、その中で最も強い L-glucose 資化能を有していた *Paracoccus* sp. 43P 株の L-glucose 代謝経路を生化学、遺伝学の両面から明らかにしたものである。生物が分解できないと考えられていた L-glucose を分解・資化する微生物の存在を示した点、さらに新規代謝経路の存在を明らかにしたという点において、本研究は学術的に大変意義深いものである。また本研究により見出された L-glucose 代謝関連酵素は既知の酵素とは全く異なる新規な基質特異性を有するものがほとんどであり、これらの酵素を利用することでこれまで困難であった希少糖質の不斉合成が可能となるだろう。最後に、本研究により得られた知見を踏まえて、生物がなぜ L-glucose ではなく D-glucose に特化した代謝系を発展させてきたのかという点について考察する。

本研究で L-glucose dehydrogenase として見出された LgdA は、酵素学的諸性質、遺伝学的観点から L-glucose 特異的な酵素であるとはいいがたく、そのため LgdA の存在は原始の地球に D-glucose と同程度の量の L-glucose が存在したという研究開始当初の仮説の妥当性を示すものではない。しかしながら、L-glucose と同様に自然界での存在が確認されていないアルドン酸、L-gluconate の異化代謝を担う *lgn* 遺伝子群の存在は、原始の地球における糖質の非生物的な生成が光学選択的なものではなかったという仮説を支持するものである。一方で L-gluconate 代謝経路は他の L 体糖質異化代謝と同様に、2 つの酸化還元酵素により D/L 変換を行う過程を含んでおり、その結果 LgnG によるアルドール開裂反応産物として D 体の Gap を生じる。従って L-gluconate のような炭素数六の L 体糖質異化代謝が発展する以前に、D 体のトリオースリン酸、Gap 特異的な代謝経路がすでに存在していたことが考えられる。これは L 体の糖質異化代謝に限ったことではなく、解糖系においても同様のことが言える。というのも、EMP 経路はもともと D-glucose を分解するための経路ではなく、D-glucose を作るための経路であったとする糖新生起源説が、近年有力視されつつある (Say *et al.* 2010)。すなわち、原始の地球において D-glucose が非生物的に生成・蓄積したため解糖系が発展したのではなく、糖新生がまず発達し、そのため D-glucose の自然界での存在比が必然的に高まり、ついで糖新生が可逆性を獲得することで解糖系が発達したことが予想されている。従って糖新生の材料となる Gap を代謝する経路は解糖系に先立って存在していたこととなり、その時点で生物は D 体の Gap に特化した代謝経路を有していたことが推察され

る。

生物におけるホモキラリティー形成の謎は、生命の起源に関わる最も重要な問題のひとつである。一般的にこの問題に関する研究は、原始的な環境下で生体分子の不斉合成の可能性を探るという化学的手法を用いて行われてきた。従ってこれまでのホモキラリティーに関する研究は、生物が出現する以前に D 体の糖、L 体のアミノ酸が生成し、蓄積したという前提に基づいたものである。一方で本研究は生物の出現時点では今日見られるホモキラリティーが完全なものではなかったという前提に基づいて、生物学的手法によりホモキラリティー形成の謎に挑んだものであり、方法論として新しいものであるといえる。本研究を通じて、glucose 代謝に見られるホモキラリティーとは、最小のキラル糖である glyceraldehyde のホモキラリティーに端を発するものであることが示唆された。もしも D 体の Gap ではなく、L 体の Gap を特異的に代謝する生物が存在するとすれば、それはこれまで知られている生物とは全く異なるものだろう。今後は本研究で用いられた手法に基づき、L 体の glyceraldehyde やそのリン酸エステルを分解できる生物を探索することで、生物におけるホモキラリティー形成の謎に対する新たな知見を得ることが期待される。

引用文献

1. Entner, N. and Doudoroff, M. (1952) Glucose and gluconic acid oxidation of *Pseudomonas saccharophila*. *J. Biol. Chem.* **196**, 853-862
2. Lamble, H. J., Heyer, N. I., Bull, S. D., Hough, D. W., and Danson, M. J. (2003) Metabolic pathway promiscuity in the archaeon *Sulfolobus solfataricus* revealed by studies on glucose dehydrogenase and 2-keto-3-deoxygluconate aldolase. *J. Biol. Chem.* **278**, 34066–34072
3. Conway, T. (1992) The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS. Microbiol. Rev.* **9**, 1-27
4. Ronimus, R. S., and Morgan, H. W. (2003) Distribution and phylogenies of enzymes of the Embden-Meyerhof-Parnas pathway from archaea and hyperthermophilic bacteria support a gluconeogenic origin of metabolism. *Archaea* **1**, 199–221
5. Bunn, H. F., and Higgins, P. J. (1981) Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science* **213**, 222–224
6. Ulrich, P., and Cerami, a (2001) Protein glycation, diabetes, and aging. *Recent progress in hormone research* **56**, 1–21
7. Gul, A., Rahman, M. A., Salim, A., and Simjee, S. U. (2009) Advanced glycation end products in senile diabetic and nondiabetic patients with cataract. *Journal of diabetes and its complications* **23**, 343–348
8. Foray, F., Hollander, D., Mcpherson, J. D., Shilton, B. H., and Walton, D. J. (1988) Fructose in Glycation and Cross-Linking. *Biochemistry*, **27**, 1901–1907
9. Chiou, S.H., ChylackL.T., Bunn, H.F. and Kinoshita, J.H. (1980) Role of non enzymatic glycosylation in experimental cataract formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**, 894-901
10. Suarezs, G., Rajaram, R., and Oronsky, L. (1989) Nonenzymatic Glycation of Bovine Serum Albumin by Fructose (Fructation). *J. Biol. Chem.* **264**, 3674–3679

11. Boutlerow, A. (1861) Bildung einer zuckerartigen Substanz durch Synthese. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **120**, 295
12. Breslow, R. (1959) On the Mechanism of the Formose Reaction. *Tetrahedron Lett.* **1**, 22-26
13. Cronin, J. R. (1997) Enantiomeric Excesses in Meteoritic Amino Acids. *Science* **275**, 951–955
14. Engel, M. H., and Macko, S. (1997) Isotopic evidence for extraterrestrial non-racemic amino acids in the Murchison meteorite. *Nature* **389**, 265–268
15. Cooper, G., Reed, C., Nguyen, D., Carter, M., and Wang, Y. (2011) Detection and formation scenario of citric acid, pyruvic acid, and other possible metabolism precursors in carbonaceous meteorites. *Proc. Natl. Acad. of Sci. U. S. A.* **108**, 14015–14020
16. Cooper, G., Kimmich, N., Belisle, W., Sarinana, J., Brabham, K., and Garrel, L. (2001) Carbonaceous meteorites as a source of sugar-related organic compounds for the early Earth. *Nature* **414**, 879–883
17. Fischer, E. (1890) Ueber die optischen Isomeren des Traubenzuckers, der Gluconsäure und der Zuckersäure. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **23**, 2611
18. Rudney, H. (1940) Utilization of L-glucose by mammalian tissues and bacteria. **92**, 112-113
19. Sasajima, K.I. and Sinskey, A.J. (1979) Oxidation of L-glucose by Pseudomonad. *Biochim. Biophys. Acta.* **571**, 120-126
20. Livesey, G. and Brown, J.C. (1995) Whole body metabolism is not restricted to D-sugars because energy metabolism of L-sugar fits computational model in rats. *J. Nutr.* **125**, 3020-3029
21. Sun, H. J., Saccomanno, V., Hedlung, B. and McKay, C. P. (2009) Stereo-specific glucose consumption may be used to distinguish between chemical and biological reactivity on Mars: a preliminary test on Earth. *Astrobiology* **9**, 443–446
22. Blackmond, D. G. (2010) The origin of biological homochirality. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**, a002147

23. Miller, G.L. (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31**, 426-428
24. Larkinn, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., and Higgins, D.G. (2007) CLUSTAL W and CLUSTAL_X version 2.0. *Bioinformatics* **23**, 2947-2948
25. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., and Kumar, S. (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Boil. Evol.* **24**, 1596–1599
26. Martínez-Romero, E. (2009) Coevolution in Rhizobium-Legume Symbiosis? *DNA Cell Biol.* **28**, 361-70
27. Baig, M.M., Kelly, S. and Loewus, F. (1970) L-Ascorbic acid biosynthesis in higher plants from L-glulono-1,4-lactone and L-galactono-1,4-lactone. *Plant Physiol.* **46**, 277–280
28. Lobanok, A.G., Sapunova, L.I., Dikhtievski, Y.O., and Kazakevich, I.O. (2001) Screening of glucose isomerase-producing microorganisms. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 259-262
29. Hemker, M., Stratmann, A., Goeke, A., Schröder, W., Lenz, J., Piepersberg, W., and Pape, H. (2001) Identification, cloning, expression, and characterization of the extracellular acarbose-modifying glycosyltransferase, AcbD, from *Actinoplanes* sp. strain SE50. *J. Bacteriol.* **183**, 4484-4492
30. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685
31. Watanabe, S., Kodaki, T., Kodak, T., and Makino, K. (2006) Cloning, expression, and characterization of bacterial L-arabinose 1-dehydrogenase involved in an alternative pathway of L-arabinose metabolism. *J. Biol. Chem.* **281**, 2612–23
32. Ochman, H., Gerber, A.S., and Hartl, D.L. (1988) Genetic application of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120**, 621-623
33. Anderson, K., Li, S.C., and Li, Y.T. (2000) Diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent, a

versatile spray reagent for revealing glycoconjugates on thin-layer chromatography plates. *Anal. Biochem.* **287**, 337-339

34. Moore, S. and Link, K.P. (1940) Carbohydrate characterization: I. The oxidation of aldoses by hypiodide methanol. *J. Biol. Chem.* **133**, 293-311
35. Yoshida, K., Yamaguchi, M., Morinaga, T., Kinehara, M., Ikeuchi, M., Ashida, H., and Fujita, Y. (2008) *myo*-inositol catabolism in *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **283**, 10415-10424
36. Ramaley, R., Fujita, Y., and Freese, E. (1979) Purification and properties of *Bacillus subtilis* inositol dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **254**, 7684-7690
37. Morinaga, T., Ashida, H., and Yoshida, K. (2010) Identification of two *scyllo*-inositol dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **156**, 1538-1546
38. McLaurin, J., Golomb, R., Jurewicz, a, Antel, J. P., and Fraser, P. E. (2000) Inositol stereoisomers stabilize an oligomeric aggregate of Alzheimer amyloid β peptide and inhibit A β -induced toxicity. *J. Biol. Chem.* **275**, 18495–18502
39. Yamaoka, M., Osawa, S., Morinaga, T., Takenaka, S., and Yoshida, K. (2011) A cell factory of *Bacillus subtilis* engineered for the simple bioconversion of *myo*-inositol to *scyllo*-inositol, a potential therapeutic agent for Alzheimer's disease. *Microbial cell factories* **10**, 69
40. Groeve, M.M., Depreitere, V., Desmet, T., Soetaert, W. (2009) Enzymatic production of α -D-galactose 1-phosphate by lactose phosphorolysis. *Biotechnol. Lett.* **31**, 1873-1877
41. Babbitt, P.C., Mrachko, G.T., Hasson, M.S., Huisman, G.W., Kolter, R., Ringe, D., Petsko, G.A., Kenyon, G.L., and Gerlt, J.A. (1995) A functionally diverse enzyme superfamily that abstracts the alpha protons of carboxylic acid. *Science* **267**, 1159-1161
42. Kim, S., and Lee, S. B. (2005) Identification and characterization of *Sulfolobus solfataricus* D-gluconate dehydratase: a key enzyme in the non-phosphorylated Entner-Doudoroff pathway. *Biochem. J.* **387**, 271–80
43. Kuorelahti, S., Jouhten, P., Maaheimo, H., Penttilä, M., and Richard, P. (2006) L-galactonate dehydratase is a part of the fungal path for D-galacturonic acid catabolism. *Mol. Microbiol.* **61**,

44. Blumenthal, H.J. and Jepson, T. (1964) Asymmetric dehydration of galactarate by bacterial galactarate dehydratase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **17**, 282-287
45. Meloche, H.P. and Wood, W.A. (1964) The mechanism of 6-phosphogluconic dehydratase. *J. Biol. Chem.* **239**, 3505-3510
46. Dreyer, J. L. (1987) The role of iron in the activation of mannonic and altronic acid hydratases, two Fe-requiring hydro-lyases. *Eur. J. Biochem.* **166**, 623-30
47. Deacon, J. and Cooper, R.A. (1977) D-galactonate utilization of enteric bacteria. The catabolic pathway in *Escherichia coli*. *FEBS. Lett.* **77**, 201-205
48. Szmilo, T. (1981) Pathway for D-galactonate catabolism in nonoathogenic mycobacteria. *J. Bacteriol.* **148**, 368-370
49. Cooper, R.A. (1979) The pathway for L-galactonate catabolism in *Escherichia coli* K12. *FEBS. Lett.* **103**, 216-220
50. Reed, J.L., Patel, T.R., Chen, K.H., Joyce, A.R., Applebee, M.K., Herring, C.D., Bui, O.T., Knight, E.M., Fong, S.S., and Palsson, B.O. (2006) System approach to refining genome annotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 17480-17484
51. Bausch, C., Peekhaus, N., Utz, U., Blais, T., Murray, E., Lowary, T., and Conway, T. (1998) Sequence analysis of the GntII (subsidiary) system for gluconate metabolism reveals novel pathway for L-idonic acid catabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3701-3710
52. Cooper, R.A. (1980) The pathway for L-gulonate catabolism in *Escherichia coli* K-12 and *Salmonella typhimurium* LT-2. *FEBS. Lett.* **115**, 63-67
53. Kalyananda, M.J., Engel, R., and Tropp, B.E. (1987) Metabolism of L-glyceraldehyde 3-phosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 2488-2493
54. Radionova, I.A., Leyn, S.A., Burkart M.D., Boucher, N., Noll, K.M., Osterman, A.L. and Rodionov, D.A. (2013) Novel inositol catabolic pathway in *Thermotoga maritima*. *Environ.*

55. Linster, C.L. and Van Schafitingen, E. (2004) A spectrophotometric assay of D-glucuronate based on *Escherichia coli* uronate isomerase and mannonate dehydrogenase. *Protein Expr. Purif.* **37**, 352-360
56. Simon, R., Priefer, U., and Puhler, A. (1983) A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nat. Biotechnol.* **1**, 784-791
57. Szpirer, C.Y., Faellen, M. and Couturier, M. (2001) Mobilization function of the pBHR1 plasmid, a derivative of the broad-host-range plasmid pBBR1. *J. Bacteriol.* **183**, 2101-2010
58. Khersonsky, O., Roodveldt, C., and Tawfik, D. S. (2006) Enzyme promiscuity: evolutionary and mechanistic aspects. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 498-508
59. Jensen, R.A. (1976) Enzyme recruitment in evolution of new function. *Annu. Rev. Microbiol.* **30**, 409-425
60. Vries, G. E. De, Harms, N., Hoogendijk, J and Stouthamer, A. H. (1989) Isolation and characterization of *Paracoccus denitrificans* mutants with increased conjugation frequencies and pleiotropic loss of a (nGATCn) DNA-modifying property. *Arch. Microbiol.* **152**, 52-57
61. Frey, J., Mudd, E. a, and Krisch, H. M. (1988) A bacteriophage T4 expression cassette that functions efficiently in a wide range of gram-negative bacteria. *Gene* **62**, 237-47
62. Baker, S. C., Ferguson, S. J., Ludwig, B., Page, M. D., Richter, O. M., and van Spanning, R. J. (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1046-1078
63. Rojas, A., Sequera, A., Guazzaroni, M.E., Telan, W., Hurtado, A., Gallegos, M.T. and Ramos, J.L. (2003) *In vivo and in vitro* evidence that TtgV is the specific regulator of the TtgGHI multidrug and solvent efflux pump of *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **185**, 4755-4763
64. Lu, D., Fillet, S., Meng, C., Alguet, Y., Kloppsteck, P., Bergeron, J., Krell, T., Gallegos, M.-T., Ramos, J., and Zhang, X. (2010) Crystal structure of TtgV in complex with its DNA operator

reveals a general model for cooperative DNA binding of tetrameric gene regulators. *Genes Dev.* **24**, 2556–65

65. Manso, I., Torres, B., Andreu, J.M., Menendez, M., Rivas, G., Alfonso, C., Diaz, E., Garcia, J.L. and Galan, B. (2009) 3-Hydroxyphenylpropionate and phenyl propionate are synergistic activators of the MhpR transcriptional regulator from *E. coli*. *J. Biol. Chem.* **284**, 21218-21228
66. Guazzaroni, M.E., Krell, T., Felipe, A., Ruiz, R., Meng, C., Zhang, X., Gallegos, M.T. and Ramos, J.L. (2005) The multidrug efflux regulator TtgV recognize a wide range of structurally different effectors in solution and complexed with target DNA: evidence from isothermal titration calorimetry. *J. Biol Chem.* **280**, 20887-20893
67. Oehler, S., Amouyal, M., Kolkhof, P., von Wilcken-Bergmann, B., and Müller-Hill, B. (1994) Quality and position of the three *lac* operators of *E. coli* define efficiency of repression. *EMBO J.* **13**, 3348–55
68. Schleif, R. (2010) AraC protein, regulation of the L-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS. Microbiol. Rev.* **34**, 779-796
69. Pouysseur, J. and Stoeber, F. (1974) Genetic control of the 2-keto-3-deoxy-d-gluconate metabolism in *Escherichia coli* K-12: kdg regulon. *J. Bacteriol.* **117**, 641-651
70. Ibañez, E., Campos, E., Baldoma, L., and Aguilar, J. (2000) Regulation of expression of the *yiaKLMNOPQRS* operon for carbohydrate utilization in *Escherichia coli*: Involvement of the main transcriptional factors. *J. Bacteriol.* **182**, 4617-4624
71. Say, R.F. and Fuchs, G. (2010) Fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase may be an ancestral gluconeogenetic enzyme. *Nature* **464**, 1077-1081

謝辞

本研究を行うにあたり研究指導教員として終始御指導、御助言いただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科准教授、中村顕先生に心より御礼申し上げます。

また研究を行ううえでの心構え、方向性について終始御指導いただきました筑波大学大学院生命環境科学研究科教授、星野貴行先生、同教授、高谷直樹先生に心より御礼申し上げます。

筑波大学大学院生命環境科学研究科教授 小林達彦先生には、本論文の作製に際しましてご指摘、ご助言を頂きましたこと深く感謝致します。

東京農業大学大学院応用生物科学部教授 矢嶋俊介先生、深野和紘修士には、タンパク質の結晶構造解析を行っていただき、心より御礼申し上げます。

神戸大学大学院農学研究科教授 吉田健一先生には、貴重なデータを提供していただき、深く感謝致します。

筑波大学研究基盤総合センター分析部門 中菌広行技官には核磁気共鳴スペクトル解析の際にご指導、ご助言を頂き、心より御礼申し上げます。

またつくばでの生活や、研究室の実験においてお世話になりました、負荷適応分子生物学研究室の先輩、同輩、後輩方に心から感謝致します。

最後に、精神的にも経済的にも支えてくれた家族に対し、心から感謝致します。